

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 537**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2006 E 10190242 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2360256**

54 Título: **Método para aislamiento de polipéptidos solubles**

30 Prioridad:

25.03.2005 US 664954 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.03.2015

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(100.0%)**

**Building M-58, EG-06B 1200 Montreal Road
Ottawa, ON K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:

TANHA, JAMSHID

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 531 537 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para aislamiento de polipéptidos solubles

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al aislamiento, identificación y manipulación de polipéptidos, especialmente fragmentos monómeros de anticuerpos humanos.

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos en los vertebrados se componen típicamente de cadenas pesada (H) y ligera (L) apareadas. El primer dominio de las cadenas H y L combinadas, el V_H y V_L , son de secuencia más variable, y esta es la porción del anticuerpo que reconoce el antígeno y se fija al mismo. Los dominios V_H y V_L reconocen el antígeno como un par.

10 El repertorio inmunológico de los Camélidos (camellos, dromedarios y llamas) es único en el sentido de que posee tipos raros de anticuerpos a los que se hace referencia como anticuerpos de cadena pesada (Hamers, Casterman C. et al., 1993). Estos anticuerpos carecen de cadenas ligeras y por tanto sus sitios de combinación están constituidos por un solo dominio, denominado V_{HH} .

15 Los anticuerpos V_{HH} recombinantes de un solo dominio (sdAbs) proporcionan varias ventajas sobre los fragmentos FV monocatenarios (scFv) derivados de anticuerpos convencionales de cuatro cadenas. Si bien los sdAbs son comparables a sus contrapartidas scFv en términos de afinidad, los mismos superan a los scFv en términos de solubilidad, estabilidad, resistencia a la agregación, susceptibilidad de replegado, rendimiento de expresión, y facilidad de manipulación del DNA, construcción de bibliotecas y determinaciones estructurales 3-D. muchas de las propiedades mencionadas de los scAbs V_{HH} son deseables en aplicaciones que implican anticuerpos.

20 Sin embargo, la naturaleza no humana de los V_{HH} s limita su uso en inmunoterapia humana debido a inmunogenicidad. A este respecto, los sdAbs V_H y V_L humanos son candidatos ideales para aplicaciones de inmunoterapia debido a que se espera que sean menos inmunógenos.

25 Los V_{HS} y V_{LS} humanos, sin embargo, son por lo general tendentes a agregación, una característica común a los V_{HS} y V_{LS} derivados de anticuerpos convencionales (Davies, J. et al., 1994; Tanha, J. et al., 2001; Ward E.S. et al., 1989). Por ello, se han realizado intentos para obtener V_{HS} y V_{LS} humanos adecuados para aplicaciones de anticuerpos. Tales V_{HS} y V_{LS} han exhibido también otras propiedades útiles típicas de los V_{HH} s tales como alto rendimiento de expresión, alta susceptibilidad de replegado y resistencia a la agregación. Bibliotecas sintéticas construidas a base de estos V_{HS} y V_{LS} como andamiajes de biblioteca podrían servir como una fuente prometedora de proteínas terapéuticas.

30 La camelización y la llamización, que implican incorporar residuos importantes de solubilidad de los V_{HH} s de camello y llama, respectivamente, en V_{HS} o V_{LS} humanos se han empleado para generar V_{HS} y V_{LS} humanos monómeros. Se ha demostrado que bibliotecas sintéticas de sdAb construidas sobre la base de estos V_{HS} y V_{LS} y generadas por aleatorización de la CDR son funcionales en términos de producción de ligantes para diversos antígenos (Davies, J. et al., 1995; Tanha J. et al., 2001).

35 En otro enfoque, se aislaron V_{HS} y V_{LS} monómeros totalmente humanos de bibliotecas sintéticas humanas de V_H y V_L sin recurrir a ingeniería de la clase arriba mencionada. En un experimento, se descubrió un V_H humano monómero cuando una biblioteca de V_H humano se lavó en batea contra lisozima de huevo de gallina (Jespers, L. et al., 2004b). Más recientemente, un método de selección basado en criterios de desplegado reversible y afinidad produjo un gran número de V_{HS} monómeros a partir de bibliotecas humanas sintéticas de V_H (Jespers, L. et al., 40 2004a). Este descubrimiento puso de manifiesto el hecho de que un método de selección apropiado es fundamental para la captura eficiente de V_{HS} humanos monómeros raros con propiedades biofísicas deseables.

Sumario de la invención

45 La invención es el resultado de un método para aislamiento de polipéptidos, preferiblemente fragmentos de anticuerpos, y muy preferiblemente V_{HS} y V_{LS} humanos con propiedades biofísicas deseables (solubilidad, estabilidad, expresión alta, naturaleza monómera, ausencia de agregación, y especificidad de fijación). El método incluye los pasos de obtener una biblioteca de presentación de fago capaz de expresar una diversidad de secuencias de polipéptidos, permitir la infección de un césped bacteriano por el fago de la biblioteca, e identificar fagos que forman calvas mayores que la media en el césped bacteriano. Los fagos se aíslan luego, y se realizan pasos para secuenciar o caracterizar de otro modo las secuencias de polipéptidos.

50 La invención proporciona polipéptidos, especialmente V_{LS} humanos monómeros, que pueden ser útiles para inmunoterapia, y/o como agentes diagnósticos o de detección. Los V_{LS} humanos monómeros pueden combinarse

también para formar dímeros, trímeros, pentámeros u otros multímeros que pueden ser útiles para inmunoterapia y/o como agentes diagnósticos o de detección.

5 Los polipéptidos identificados en esta memoria, que incluyen V_L s humanos, pueden ser manipulados por métodos tales como desordenamiento del DNA para seleccionar propiedades biofísicas mejoradas tales como solubilidad, estabilidad, naturaleza monómera, expresabilidad alta, especificidad de fijación y origen humano.

10 Los polímeros identificados en esta memoria, que incluyen V_L s, pueden utilizarse también para generar bibliotecas de presentación ulteriores, las cuales pueden utilizarse luego a su vez para aislar polipéptidos adicionales por el método anterior.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

15 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un fragmento de anticuerpo V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

20 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para producir polipéptidos con propiedades biofísicas deseables, que comprende los pasos de a) proporcionar una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento de anticuerpo conforme a la reivindicación 1 o la reivindicación 2; b) proporcionar secuencias de oligonucleótidos con codones aleatorizados; c) incorporar los oligonucleótidos aleatorizados en la secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del fragmento de anticuerpo, de tal modo que una o más de las CDRs está aleatorizada; y d) expresar las secuencias de nucleótidos producidas en el paso (c).

25

Descripción Detallada de los Dibujos

Leyendas de las figuras

30 **Figura 1.** Una representación gráfica de los resultados de ejemplos seleccionados: el contraste en el tamaño de calva entre fagos que presentan un V_H soluble (HVHP428) y aquéllos que presentan uno insoluble (BT32/A6). La fotografía muestra una parte de la placa de agar de césped bacteriano que se amplió para mejorar la visualización de la calva. Aunque la placa contenía un número igual de cada uno de los dos tipos de calva, la fotografía contiene esencialmente las calvas HVHP428, de tamaño grande. La mayoría de las calvas BT32/A6 eran demasiado pequeñas para producir imágenes claras bien definidas en la fotografía. Por tanto, las calvas marcadas por flechas representan una proporción menor de fagos BT32/A6 que eran lo suficientemente grandes para ser visibles en esta imagen. Los asteriscos marcan tamaños de calva representativos para los fagos HVHP428. Las identidades de las calvas se determinaron por secuenciación del DNA.

40 **Figura 2.** Secuencia de aminoácidos de los V_H s humanos seleccionados sobre la base de la afinidad para la proteína A y el tamaño de la calva. Los puntos en las entradas de la secuencia indican identidad de aminoácidos con HVHP2M10 o HVHP44. Se incluyen guiones para alineación de las secuencias. Los residuos en las posiciones de solubilidad principales y el residuo 57T que se asocia con V_H s/ V_H Hs con la propiedad de fijación de proteína A se muestran en negrilla. Se utiliza el sistema de numeración Kabat. El valor de la "frecuencia" total es 114.

CDR = región determinante de la complementariedad; FR = región de entramado; gln seq = secuencia de la línea germinal

45 **Figura 3.** Tendencias de agregación de los V_H s humanos. Cromatogramas de filtración en gel que comparan el estado de oligomerización de un V_H humano aislado en este estudio (HVHP428) con el de un V_H H de llama (H11C7) y un V_H humano típico (BT32/A6). El pico que se eluye en último lugar en cada cromatograma corresponde al V_H monómero. El pico H11C7 dímero está marcado por una flecha. B, espectros 1H NMR unidimensionales de HVHP414 a 800 MHz (i), HVHP423 a 500 MHz (ii) y HVHP428 a 800 MHz (iii). Los espectros en el panel izquierdo están aumentados a escala con un factor de dos a fin de permitir una mejor observación de las señales de baja intensidad.

55 **Figura 4.** Estabilidad de los V_H s humanos en términos de su resistencia a tripsina a 37°C y su integridad después de incubación larga a 37°C. A, SDS-PAGE que compara las movilidades del V_H HVHP414 sin tratar y tratado con tripsina a los 15, 30 y 60 min con relación a un marcador de 21 kDa. HVHP414-cMyc denota V_H de HVHP414 que carece del c-Myc. B, perfiles de masa molecular obtenidos por espectrometría de masas de V_H de HVHP414 sin tratar y tratado con tripsina (60 min). El perfil de la espectrometría de masas del V_H tratado se ha superpuesto al correspondiente al del V_H sin tratar para proporcionar una mejor comparación visual. La masa molecular experimental del V_H sin tratar es 14.967,6 Da, que es esencialmente idéntica a la masa molecular esperada, 14.967,7 Da. La masa molecular observada del V_H tratado con tripsina (13.368,5 Da) indica la pérdida de 13 aminoácidos en el término C por escisión en K (Lys) en la etiqueta de c-Myc para dar una masa molecular esperada

de 13368,0 Da. El sitio de escisión de tripsina se muestra por una flecha vertical encima de la secuencia de aminoácidos de HVHP414. C, cromatogramas de filtración en gel que comparan el estado de oligomerización del V_H HVHP420 tratado a 37°C (perfil superior) con el del V_H sin tratar (perfil inferior). Los cromatogramas se desplazaron verticalmente debido a que no podían distinguirse cuando estaban superpuestos. Los picos mayor y menor en cada cromatograma corresponden a V_{HS} monómeros y dímeros, respectivamente. El V_H dímero constituye 3% de la proteína total. El recuadro muestra las superposiciones de sensogramas para la fijación de HVHP420 tratado a 37°C a la proteína A a diversas concentraciones. Los V_{HS} utilizados para estudios de estabilidad térmica procedían de stocks que habían estado ya a 4°C durante varios meses.

Figura 5. Superposiciones de sensogramas que muestran la fijación de HVHP423 nativo (líneas gruesas) y replegado (líneas delgadas) a la proteína A inmovilizada a concentraciones de 75, 100, 150 y 200 nM. K_{DN} y K_{Dref} se calcularon a partir de los sensogramas respectivos y se utilizaron para determinar RE como se describe más adelante.

Figura 6. Secuencias de aminoácidos de los V_L s humanos seleccionados basadas en afinidad para la proteína L y tamaño de calva. Los puntos en las entradas de la secuencia indican identidad de aminoácidos con HVLP333. Se incluyen guiones para alineación de la secuencia. Véase la BASE V (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?module=pagemaster&PAGE_user_op=view_page&PAGE_id=7&MMN_position=5:5) para numeración de las secuencias y designación de la CDR. L6, A27, L2, L16, O2/O12, A30 y 1b son designaciones de la línea germinal V. Las designaciones de la línea germinal J aparecen entre paréntesis. NF, no encontrado.

Figura 7. Cromatogramas de exclusión por tamaños de dominios V_L humanos. En A, se aplicaron los V_L s a una concentración de 0,6 mg/ml. En B, se aplicaron los V_L s a su máxima concentración disponible: HVLP342, 1,0 mg/ml; HVLP3103, 5,9 mg/ml; HVLP335, 4,9 mg/ml, HVLP351, 0,89 mg/ml. "#" y "*" representan picos agregados y monómeros, respectivamente. Los agregados se eluyen en el volumen de exclusión. El pico marcado por una flecha en el panel HVLP342 (B) es el arrastre de una operación previa.

Figura 8. Superposiciones de sensogramas que muestran la fijación de V_L s a la proteína L inmovilizada a concentraciones de 0,2, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 5 y 10 μ M (HVLP389, HVLP351 y HVLP364); 1, 2, 3, 5, 7,5 y 10 nM (HVLP342); 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 5 y 10 μ M (HVLP335); 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2 y 5 μ M (HVLP325), 0,2, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3 y 5 μ M (HVLP3103) y 1, 2, 3, 4, 5 y 6 nM (HVLP324). Los sensogramas para las fijaciones de HVLP324 y HVLP342 al sitio de baja afinidad de la proteína L no se incluyen, pero los KDs calculados se registran en la Tabla 3.

Figura 9. Fijaciones de HVHP328PTV2 a proteína A y HVLP335PTV2 a proteína L en experimentos de resonancia de plasmones de superficie. (A) Superposiciones de sensogramas que muestran la fijación de HVH28PTV2 a proteína A inmovilizada a concentraciones de 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 nM. (B) Superposiciones de sensogramas que muestran la fijación de HVLP335PTV2 a proteína L inmovilizada a concentraciones de 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 y 4,5 nM. Los datos de fijación se registran en la Tabla 4.

Figura 10. Figura que muestra los resultados de los experimentos de microaglutinación con células de *S. aureus*. La concentración de los pentámeros decrece dos veces desde el pocillo 1 al pocillo 11, teniendo el pocillo 12 los pentámeros reemplazados con tampón de PBS. Los pocillos de la fila superior contienen pentámero de HVHP328PTV2 y los del fondo pentámero HVLP335PTV2. Las concentraciones de los pentámeros en los pocillos 1 a 6 son 215, 108, 54, 27, 13 y 7 μ g/ml, respectivamente.

Descripción Detallada de la Invención

Es deseable identificar polipéptidos, especialmente fragmentos de anticuerpo, que son de origen humano, solubles, estables, resistentes a la agregación, replegables, fuertemente expresados, que se manipulan fácilmente al nivel de DNA, y son ideales para construcción de bibliotecas y para determinaciones de andamiaje tridimensional. Tales fragmentos de anticuerpo son útiles para una gran diversidad de aplicaciones inmunoterapéuticas, y también como agentes diagnósticos y de detección. Los anticuerpos V_H y V_L humanos monómeros son particularmente interesantes, dado que es probable que tengan muchas de las propiedades arriba mencionadas.

Se pueden identificar polipéptidos con las propiedades antes mencionadas por cribado de alta capacidad de bibliotecas capaces de expresar una diversidad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, bibliotecas de presentación de fago (preferiblemente de fago filamentoso tal como M13 o fd) pueden cribarse por infección de un campo de bacterias sensibles al fago (un césped bacteriano) con el fago, seguido por determinación de qué fagos han lisado satisfactoriamente las bacterias buscando las áreas claras exentas de bacterias, conocidas como calvas. Los fagos que exhiben V_{HS} y V_L s monómeros llamizados forman calvas de mayor tamaño en los céspedes bacterianos que los fagos que exhiben V_{HS} totalmente humanos con tendencias a la agregación. Así, el tamaño de las calvas puede utilizarse como medio de identificación de V_{HS} y V_L s monómeros raros existentes naturalmente del repertorio de V_H humanos.

El método descrito en esta memoria es útil también en la identificación de fragmentos de anticuerpos V_H y/o V_L humanos solubles y estables (la estabilidad abarca varias características, que incluyen, pero sin carácter limitante,

eficiencia de replegado térmico alta, temperatura de fusión alta, mantenimiento de la funcionalidad después de larga incubación (de varios días) a 37°C, resistencia a los desnaturalizantes químicos, resistencia a las proteasas, teniendo una vida útil larga a temperaturas inferiores a 0°C, y 4°C, y a la temperatura ambiente, mantenimiento de la funcionalidad en ambientes intracelulares, y mantenimiento de la funcionalidad en el interior del cuerpo humano, por ejemplo en el torrente sanguíneo) y expresión alta de proteínas de diferentes orígenes, incluyendo:

1. V_Hs, V_Ls, Fabs, scFvs y anticuerpos enteros tales como IgGs, más específicamente los humanos
2. Variantes de proteínas basadas en andamiajes distintos de anticuerpos monocatenarios receptores de células T, dominios de receptores de células T, transferrina, lipocalinas, dominios Kunitz, repeticiones de anquirina, y antígeno asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), con inclusión de los humanos
3. Vacunas, tales como vacunas de proteínas virales y bacterianas
4. Proteínas terapéuticas, v.g., insulina, hormona del crecimiento, eritropoyetina
5. Reactivos proteínicos de diagnóstico y bioquímicos, v.g., proteína A, proteína G.

Los polipéptidos identificados por este método pueden utilizarse para construir bibliotecas adicionales. Esto se hace seleccionando una secuencia de ácido nucleico de, por ejemplo, un V_H. Se crean oligonucleótidos con codones aleatorizados y se incorporan en la secuencia de V_H. Así, cada oligonucleótido singular se incorpora en un gen de V_H, y los genes de V_H modificados constituyen una biblioteca de secuencias con ligeras variaciones. Típicamente, los oligonucleótidos están diseñados de tal manera que las CDRs o los bucles del V_H están aleatorizados. Por ejemplo, una, dos o las tres CDRs del V_H pueden estar aleatorizadas. La biblioteca de V_H se clona luego en un vector apropiado, dependiendo del tipo de biblioteca a utilizar, y las secuencias de ácido nucleico se expresan como polipéptidos. La biblioteca se somete a cribado respecto a moléculas que se fijan a los polipéptidos de la biblioteca, típicamente por lavado en batea. Las bibliotecas pueden ser bibliotecas de presentación de fago, u otras bibliotecas de presentación tales como presentación de ribosoma y presentación de levadura.

Los polipéptidos identificados por el método dado a conocer en esta memoria pueden utilizarse para inmunoterapia mediante, por ejemplo, la reticulación de monómeros para formar dímeros, trímeros, pentámeros y otros multímeros. Esto puede dar como resultado mejor afinidad para moléculas de antígeno y velocidades de disociación más lentas para algunos antígenos. Otro método posible consiste en enlazar o fusionar polipéptidos a una diversidad de moléculas con diversas funciones. Por ejemplo, pueden enlazarse fragmentos de anticuerpos a radionucleidos, fármacos citotóxicos, toxinas, péptidos, proteínas, enzimas, liposomas, lípidos, superantígenos de células T o virus a fin de direccionarse a y destruir o modificar células o moléculas específicas.

Una vez que los V_Hs o V_Ls identificados por el método de selección descrito en esta memoria han sido aislados, los mismos pueden manipularse ulteriormente para seleccionar propiedades biofísicas mejoradas, tales como solubilidad, estabilidad, naturaleza monómera, especificidad de fijación, origen humano o expresabilidad alta. Esto puede lograrse por técnicas de recombinación *in vitro* tales como desordenamiento del DNA o un proceso de extensión escalonado. El desordenamiento del DNA implica cortar la secuencia de ácido nucleico de los polipéptidos primero (donante) y segundo (aceptor), tales como fragmentos de anticuerpo, en fragmentos aleatorios, y ensamblar luego los fragmentos aleatorios por una reacción de tipo PCR. Los fragmentos reensamblados se someten luego a cribado para seleccionar las propiedades deseadas.

Por ejemplo, uno o más V_Hs con estabilidad alta (donantes) puede(n) mezclarse con uno o más V_Hs que carecen de estabilidad suficiente (aceptores) y someterse a desordenamiento del DNA. Esto genera mutantes de los V_Hs aceptores que tienen residuos de estabilidad incorporados procedentes de los V_Hs donantes. Los mutantes ahora estables pueden identificarse por los métodos descritos en esta memoria, o por otros sistemas de cribado de proteínas evolutivas tales como presentación de ribosoma, presentación de levadura, presentación de células bacterianas y presentación de fago. Análogamente, esta técnica puede utilizarse para transferir características deseables tales como solubilidad, naturaleza monómera, y expresión alta.

Esta técnica puede utilizarse en el caso en que ambos V_Hs donante y aceptor tienen propiedades deseables, para producir un V_H con ambas propiedades. Por ejemplo, un V_H donante inestable que se fija a un ligando terapéutico o diagnóstico importante puede desordenarse con un V_H aceptor estable. Para asegurarse de que los nuevos V_Hs estables generados tienen también la capacidad de fijarse al ligando, el sistema de cribado puede implicar un paso de fijación de ligando.

El desordenamiento del DNA puede ser útil también para humanizar V_Hs no humanos tales como dominios variables de anticuerpos de cadena pesada de camélidos y dominios variables de tiburón nodriza y tiburón alfombra, o V_Ls no humanos que se fijan a dianas terapéuticas. V_Hs y V_Ls humanos con propiedades deseables tales como solubilidad, estabilidad, naturaleza monómera y expresabilidad alta pueden utilizarse como donantes. Por ejemplo, uno o más V_Hs humanos con estabilidad satisfactoria (donantes) puede(n) mezclarse con uno o más V_Hs terapéuticos no humanos (aceptores) y someterse a desordenamiento del DNA. Esto genera mutantes de los V_Hs aceptores que son a la vez estables y humanizados. Los mutantes humanizados y estables nuevamente generados pueden identificarse por métodos descritos en esta memoria, o por otros sistemas de cribado de proteínas evolutivas tales como presentación de ribosoma, presentación de levadura, presentación de células bacterianas y presentación de

fago. En un ejemplo adicional, el V_H aceptor podría ser un V_HH terapéutico (dominio variable de anticuerpo de cadena pesada de camélido).

5 Adicionalmente, esta técnica es útil también para seleccionar propiedades deseables de polipéptidos distintos de V_Hs y V_Ls. Como se ha expuesto anteriormente, el polipéptido donante y el polipéptido aceptor pueden ser ambos humanos, o el donante puede ser humano y el aceptor no humano.

10 Un posible método para impartir solubilidad, naturaleza monómera, expresabilidad alta o estabilidad a V_Hs y V_Ls puede ser por injerto de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) en V_Hs y V_Ls aceptores. Dado que se sabe que las CDRs están implicadas en la solubilidad y estabilidad de los anticuerpos mono-dominio, y de acuerdo con ello, el injerto de estas regiones, tales como las CDRs de V_Hs y V_Ls aislados por los métodos descritos en esta memoria, puede impartir solubilidad y/o estabilidad a V_Hs y V_Ls aceptores.

V_Hs y V_Ls humanos monómeros

15 Se identificaron varios V_Hs humanos monómeros con diferentes secuencias de la línea germinal y totales (véase Figura 1 y las SEC ID N° 8 a 22) de una biblioteca de presentación de fago V_H humano naif por este método de selección basado en el tamaño de las calvas de fago. Los V_Hs se mantienen funcionales y en forma monómera después de tratamiento con tripsina a 37°C, semanas de incubaciones a 37°C o meses de almacenamiento a 4°C, tienen altas eficiencias de repliegado térmico, se producen con buenos rendimientos en E. coli y poseen actividad de fijación de la proteína A.

20 Se identificaron además varios V_Ls humanos monómeros (véase la Figura 6 y las SEC ID N° 23 a 54). Los V_Ls se producen también con buenos rendimientos en E. coli y poseen actividad de fijación de proteína L.

25 Dichas propiedades serán manifestadas también por V_Hs de bibliotecas sintéticas que utilicen los V_Hs anteriores como andamiaje. Así, tales bibliotecas pueden producir V_Hs terapéuticos o de diagnóstico que podrían tener eficacia satisfactoria a temperatura fisiológica, vida útil prolongada y una producción eficaz en costes. La característica de alta eficiencia de repliegado térmico podría aumentar adicionalmente las aplicaciones biotecnológicas de estas bibliotecas a situaciones en las cuales se requieran fijadores de V_H para mantener su actividad después de exposición a temperaturas altas transitorias. Los V_Hs podrían ser también muy adecuados para aplicaciones intracorpóreas debido a sus propiedades biofísicas deseables. La propiedad de fijación de la proteína A simplificará la purificación y detección de V_H en tests de diagnóstico, inmunotransferencia e inmunocitoquímica y puede aprovecharse para mejorar la eficiencia de las bibliotecas por retirada de los V_Hs no funcionales de las mismas.

30 Análogamente, las bibliotecas que utilizan V_Hs como entramado producirán V_Ls terapéuticos o de diagnóstico que tengan propiedades análogamente deseables. Dado que los V_Ls se fijan con la proteína L, la purificación y detección de V_L se simplifica aprovechando la ventaja de esta propiedad de fijación de la proteína L.

Las bibliotecas de presentación construidas sobre los V_Hs y V_Ls presentes pueden ser también una fuente útil de agentes diagnósticos y de detección.

35 Los V_Hs totalmente humanos consignados anteriormente con propiedades biofísicas favorables estaban basados en una secuencia de la línea germinal V simple: DP-47 ((Jespers, L. et al., 2004b; Jespers, L. et al., 2004a). La observación de que los V_Hs humanos monómeros de este estudio proceden de 6 secuencias de la línea germinal diferentes con inclusión de DP-47, demuestra que los V_Hs estables no están restringidos en términos de uso de genes de la línea germinal. De hecho, es muy probable que los autores de la invención hubieran aislado V_Hs monómeros de familia y orígenes de línea germinal diferentes de los que se describen en esta memoria si no hubieran restringido la selección a un subconjunto de V_Hs de la familia V_H3 con actividad de fijación de la proteína A. No es posible concretar aquí las mutaciones de aminoácidos (Tabla 1) responsables del comportamiento biofísico observado de los presentes V_Hs debido a la aparición de mutaciones múltiples en V_Hs y al hecho de que se sabe también que CDR3 está implicado en la conformación de los perfiles biofísicos de sdAbs. Es posible, sin embargo,

45 que mutaciones en las posiciones que se saben son importantes para la estabilidad y solubilidad de los sdAbs, v.g., V37F en HVHP423 y HVHP44B, o mutaciones que aparecen múltiples veces en la misma posición, v.g., L5V/Q y V5Q en nueve V_Hs, tengan un papel en la determinación de las propiedades biofísicas de V_Hs. En términos de construcción de bibliotecas, sería deseable que el carácter monómero de los presentes V_Hs no sea dependiente de CDRs, en particular CDR3, a fin de que la aleatorización de CDR pueda realizarse sin la preocupación de comprometer la estabilidad de la biblioteca. A este respecto, los V_Hs con CDR3 menor, v.g., HVHP82, pueden ser andamiajes preferidos, dado que ello implicaría menos dependencia de CDR3 para la estabilidad.

50 La diversidad de los presentes V_Hs y V_Ls en términos de secuencia global y longitud de CDR3 debería permitir la construcción de bibliotecas más eficientes. Se han construido bibliotecas sintéticas de V_H sobre andamiajes simples. Un método de este tipo para generación de repertorios está en contraste acusado con el "enfoque" *in vivo* que utiliza una multiplicidad de andamiajes. Basándose en las secuencias aquí consignadas puede aprovecharse la ventaja de la disponibilidad del diverso conjunto de V_Hs y V_Ls y crear bibliotecas que están basadas en andamiajes múltiples de V_H y V_Ls. Tales bibliotecas podrían ser una emulación mejor de repertorios *in vivo* y, por tanto, podrían tener una complejidad más óptima. De las tres CDRs existentes en sdAbs, la CDR3 contribuye generalmente en un grado más

- importante a la diversidad de repertorios, y por esta razón la aleatorización de la CDR3 en los andamiajes de V_H y V_L de va acompañada típicamente por una variación concomitante de la longitud de CDR3. Si bien esto mejora significativamente la complejidad de la biblioteca, puede también poner en compromiso la estabilidad de la biblioteca por fragmentar la longitud del andamiaje de CDR3 parental. La heterogeneidad de los V_H s y V_L s dados a conocer en esta memoria en términos de longitud de CDR3 permite la creación de bibliotecas que tienen a la vez complejidad, estabilidad y características biofísicas satisfactorias. Tales bibliotecas podrían estar constituidas preferiblemente por sub-bibliotecas, donde cada sub-biblioteca está creada por aleatorización de la CDR3 (y aleatorización de CDR1 y/o CDR2, en caso deseado) sobre un andamiaje V_H o V_L s simple sin fragmentar la longitud de la CDR3 parental.
- 5 La versatilidad de los presentes V_H s y V_L s es beneficiosa también en términos de selección de un andamiaje V_H o V_L s óptimo para humanización de los V_{HH} s, V_{HS} y V_{LS} que son específicos para dianas terapéuticas. Pueden obtenerse V_{HH} s de camélido con afinidad alta contra dianas terapéuticas a partir de bibliotecas de V_{HH} inmunes, no inmunizados o sintéticos con relativa facilidad y someterse subsiguientemente a humanización (injerto de CDR, revestimiento de la superficie, desinmunización) para eliminar una posible inmunogenicidad de V_{HH} , proporcionando con ello una alternativa al método de la biblioteca de V_H humano para producción de V_{HS} terapéuticos. La generación de V_{HS} terapéuticos de afinidad alta por el último método puede requerir a menudo maduración por afinidad adicional tediosa y consumidora de tiempo *in vitro* del o de los ligantes conductores seleccionados a partir de las bibliotecas de V_H humano sintéticas primarias.
- 10 V_{HS} no humanos contra dianas terapéuticas pueden obtenerse a partir de bibliotecas de V_H inmunes, no inmunizadas o sintéticas con relativa facilidad y someterse subsiguientemente a humanización (injerto de CDR, revestimiento de la superficie, desinmunización) para eliminar la inmunogenicidad de V_H no humano, proporcionando con ello una alternativa al método de la biblioteca de V_H humana para producción de V_{HS} terapéuticos.
- 15 Pueden obtenerse V_{LS} no humanos contra dianas terapéuticas a partir de bibliotecas de V_H inmunes, no inmunizadas o sintéticas con facilidad relativa, y someterse subsiguientemente a humanización (injerto de CDR, revestimiento de la superficie, desinmunización) para eliminar la inmunogenicidad de V_H , proporcionando con ello una alternativa al método de la biblioteca de V_L humano para producción de V_{LS} terapéuticos.
- 20 Se han descrito cierto número de enfoques evolutivos para la selección de proteínas con propiedades biofísicas mejoradas (Forrer, P. et al., 1999; Waldo, G.S., 2003); (Jespers, L. et al., 2004a; Jung, S. et al., 1999; Matsuura, T. et al., 2003). Típicamente, se requiere una presión de estabilidad para asegurar la selección preferencial de las variantes estables sobre las inestables o menos estables, de una población de biblioteca. Por ejemplo, en un trabajo afín, se requirió tratamiento térmico de bibliotecas de presentación del fago V_H para seleccionar V_{HS} resistentes a la agregación (Jespers, L. et al., 2004a). Ejemplos de enfoques de selección evolutivos que implican presentación de fago incluyen presentación de fago convencional, fagos selectivamente infectivos y los enfoques de proteólisis. En los dos primeros enfoques se utiliza selección por afinidad para seleccionar especies estables de una biblioteca, basadas en la hipótesis de que las proteínas estables poseen mejores propiedades de fijación a su ligando que las inestables. Sin embargo, aun con la inclusión adicional de un paso de selección por estabilidad, estos enfoques pueden enriquecer fundamentalmente por mayor afinidad más que por mayor estabilidad (Jung, S. et al., 1999). Un requerimiento de pasos de fijación limita también la aplicabilidad de estos enfoques a proteínas con ligandos conocidos. El tercero, enfoque de proteólisis, está basado en el hecho de que las proteínas estables son generalmente compactas y por consiguiente son resistentes a las proteasas, mientras que las inestables no lo son. El formato de presentación de fago se modifica por ingeniería genética de tal manera que la estabilidad a las proteasas de la proteína presentada se traduce en infectividad del fago. Así, cuando una biblioteca variante de presentación de fago se trata con una proteasa, únicamente los fagos que exhiben proteínas estables retienen su infectividad y pueden seleccionarse subsiguientemente por infección de un *E. coli* hospedador. Dado que este enfoque es independiente de la fijación de ligandos, el mismo es de utilidad general. Sin embargo, incluso las proteínas estables y bien plegadas tienen sitios sensibles a las proteasas, v.g. bucles y enlazadores, y esto podría impedir en algunos casos la selección de especies estables en un enfoque de proteólisis (Ban, Y. et al., 2004).
- 30 En contraste, en el presente enfoque evolutivo, las proteínas con propiedades biofísicas superiores se identifican directamente a simple vista. El enfoque no requiere pasos de fijación de ligando, proteólisis o desestabilización, y por consiguiente evita complicaciones que pueden encontrarse en los enfoques de selección indicados. La ausencia de requerimiento de un paso de fijación significa también que este enfoque tiene utilidad general. Como opción, puede incluirse un paso de fijación para asegurar que las proteínas seleccionadas sean funcionales. Sin embargo, la dependencia del presente enfoque respecto a la extensión en placas (para visualización de las calvas) introduce una posible limitación logística en términos de números de placas que pueden ser manipuladas y limita por tanto su aplicación a bibliotecas más pequeñas. No obstante, la utilidad del presente enfoque puede extenderse a grandes bibliotecas, si la biblioteca se reduce primero a un tamaño manejable. Esto puede hacerse, por ejemplo, por incorporación en el sistema de selección de un paso que pudiera eliminar grandes poblaciones de especies inestables, v.g., la adsorción de la biblioteca en una superficie de proteína A, o en una columna de interacción hidrófoba para eliminar proteínas deficientemente plegadas con superficies hidrófobas expuestas (Matsuura, T. et al., 2003). En este caso, el enfoque se utilizó para seleccionar V_{HS} y V_{LS} con buenas propiedades biofísicas en un

fondo de V_{HS} y V_{LS} muy inestables. Sin embargo, puede ser más difícil seleccionar las especies "óptimas" de una biblioteca de mutantes que está poblada con proteínas que poseen estabilidades razonablemente satisfactorias. En este caso, las variantes principales pueden identificarse basándose en la tasa de formación de calvas utilizando tiempos de incubación más cortos, o basándose en criterios de tamaño de calva y frecuencia.

5 El presente enfoque de selección puede extenderse a la identificación de fragmentos de anticuerpo estables y bien plegados tales como scFvs y Fabs con la inclusión opcional, en el sistema de selección, de un paso de fijación que implica proteína L, A o cualquier ligando, así como andamiajes estables distintos de anticuerpos y variantes de los mismos. Además, la correlación observada entre el tamaño de las calvas de fago y el rendimiento de expresión de V_H significa que es posible utilizar el presente método para adquirir versiones de alta expresión de proteínas cuya expresión en caso contrario sería deficiente o insatisfactoria a partir de bibliotecas mutantes de presentación de fago. Esta aplicación sería particularmente atractiva en el caso de proteínas terapéuticas o reactivos proteínicos caros de expresión deficiente en donde la expresión de proteínas de refuerzo podría contrarrestar significativamente el coste de la producción de proteínas.

15 **Análisis de fijación de pentámeros**

Tanto los V_{LS} como los V_{HS} son susceptibles de pentamerización, y la pentamerización puede utilizarse para convertir rápidamente un monómero de V_L o V_H de afinidad baja en un pentámero de V_L o V_H de afinidad alta. Tales pentámeros son agentes inestimables de diagnóstico y detección. En dichas aplicaciones, la fijación de un pentámero de V_L o V_H a su diana puede ser detectada por una molécula informadora tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina), o una molécula fluorescente conjugada al pentámero. Alternativamente, la fijación del pentámero puede ser detectada por una molécula secundaria que se conjuga a una molécula informadora. La molécula secundaria puede ser específica del pentámero propiamente dicho o de un marcador del mismo, tal como un marcador 6His o marcador c-Myc. Por ejemplo, una molécula secundaria típica es una inmunoglobulina.

Las interacciones entre los V_{HS} y proteína A, y V_{LS} con proteína L son fundamentalmente diferentes de las existentes entre V_{HS} y V_{LS} con sus antígenos diana. La fijación de antígeno de un V_H o un V_L implica tres bucles de fijación de antígeno que forman el sitio de combinación de un dominio de anticuerpo. La fijación a proteína A de un V_H con actividad de fijación de proteína A y un V_L con actividad de fijación de proteína L implican sitios de fijación y residuos en los dominios de anticuerpo que son totalmente distintos del sitio de combinación del anticuerpo. Así, un V_H con actividad de fijación de proteína A puede fijarse simultáneamente a proteína A y su antígeno diana, y un V_L con actividad de fijación de proteína L puede fijarse simultáneamente a la proteína L y su antígeno diana. Dado que los V_{HS} y V_{LS} presentes tienen afinidad para las proteínas A y L respectivamente, pueden utilizarse proteína A y L como la molécula secundaria para las aplicaciones de detección y diagnóstico arriba mencionadas. Los pentámeros V_H y V_L humanos pueden utilizarse también para terapia.

Detección de patógenos por los pentámeros

40 La actividad de fijación de las proteínas A y L de los V_{HS} y V_{LS} puede utilizarse para detectar bacterias que tienen proteína A y/o L en sus superficies. La proteína A está presente en la superficie de las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*. Así, los V_{HS} con actividad de fijación de proteína A tales como los descritos en esta memoria pueden utilizarse para detectar *S. aureus*. Análogamente, los monómeros V_L y pentámeros V_L con actividad de fijación de proteína L se pueden utilizar para la detección de bacterias, en particular bacterias patógenas tales como *Peptostreptococcus magnus*, que tienen proteína L en su superficie celular.

La proteína L está implicada como factor virulento en la patogénesis de *P. magnus* (Ricci, S. *et al.*, 2001) en los humanos. En la vaginosis, se cree que la proteína L ejerce su efecto por reticulación de la IgE asociada a la superficie. Los monómeros y/o pentámeros V_L con actividad de fijación de proteína L tienen potencial como agentes terapéuticos, dado que podrían interferir con la acción de reticulación de la IgE de la proteína L.

La proteína A está implicada como factor virulento en la patogénesis de *S. aureus* en humanos (Fournier, B. *et al.*, 2004). Su virulencia ha sido atribuida a su capacidad de interactuar con componentes del hospedador, con inclusión de la fijación a anticuerpos. Los monómeros y/o pentámeros V_H con actividad de fijación de la proteína A tienen potencial como agentes terapéuticos, dado que podrían interferir con la interacción de la proteína A con componentes del hospedador.

EJEMPLOS

Identificación y análisis de secuencia de V_{HS} humanos monómeros

60 Durante el curso de la construcción de bibliotecas de V_H totalmente humanos y humanos llamizados, se descubrió que los fagos que exhibían V_{HS} llamizados monómeros formaban calvas mayores en céspedes bacterianos que los fagos que exhibían V_{HS} totalmente humanos con tendencias a agregación. Por ello, se utilizó el tamaño de las calvas

como medio para la identificación de V_H s monómeros raros, existentes naturalmente a partir del repertorio de V_H s humanos (**Figura 1**). A este fin, se construyó una biblioteca de fagos que exhibía V_H s humanos con un tamaño de 6×10^8 y se propagó en forma de calvas en placas de agar. En las placas de titulación, la biblioteca estaba constituida esencialmente por pequeñas calvas intercaladas con algunas grandes. La PCR en 20 clones reveló que las calvas pequeñas correspondían a los fagos que presentaban V_H , mientras que las grandes representaban los fagos de tipo salvaje, es decir, fagos que carecían de inserciones de la secuencia V_H . No se encontró ninguno de los fagos que presentaban V_H con morfología de calvas grandes. Esto no era inesperado, dada la escasez de V_H s monómeros en el repertorio humano y el gran tamaño de la biblioteca. Para facilitar la identificación de V_H s monómeros, se decidió reducir la biblioteca a un tamaño manejable y eliminar los fagos de tipo salvaje causantes de interferencia con morfología de gran tamaño de calva por lavado en batea de la biblioteca contra proteína A que se fija a un subconjunto de V_H s humanos de la familia V_H3 .

Después de unas cuantas tandas de lavado en batea, la biblioteca se enriqueció en fagos que producían calvas grandes, y la PCR y la secuenciación de más de 110 de dichas calvas demostraron que todas ellas tenían marcos de lectura abiertos V_H completos. El tamaño de las calvas grandes que se seleccionaron para análisis se representa en la Figura 1. La secuenciación reveló 15 V_H s diferentes que pertenecían a la familia V_H3 y utilizaban segmentos V de línea germinal DP-38, DP-47, V3-49, V3-53, YAC-5 u 8-1B (**Tabla 1; Figura 2**). Las secuencias de línea germinal DP-38 y DP-47 se han visto implicadas con anterioridad en fijación de proteína A. Adicionalmente, todos los V_H s tenían un residuo Thr en la posición 57 (**Figura 2**), consistente por su actividad de fijación de proteína A. El segmento V de la línea germinal utilizado más frecuentemente era DP-47, que existía en más del 50% de los V_H s, pero el clon más frecuente (a saber, HVHP428; frecuencia relativa 46%) utilizaba el segmento V de la línea germinal V3-49. HVHP429, con una secuencia de línea germinal DP-47, era el segundo V_H más abundante con una frecuencia relativa de 21% (**Figura 2**). Las longitudes de CDR3 V_H abarcaban desde 4 aminoácidos para HV_HB82 hasta 16 aminoácidos para los aminoácidos de HVHP430, teniendo HVHP430 un par de residuos Cys en CDR3. Se observaron mutaciones de aminoácidos con respecto a las secuencias del segmento V de la línea germinal parental (residuos 1-94) y FR4 (residuos 103-113), en todos los V_H s y estaban comprendidas entre dos mutaciones para HVHP44 (L5V y Q105R) y HV_HB82 (E1Q y L5Q) hasta 16 mutaciones para HVHP426 (Tabla 1). Las mutaciones se concentraban en los segmentos V; se detectaron sólo dos mutaciones en la totalidad de los 15 FR4s, en las posiciones 105 y 108. HVHP44 y HV_HB82 diferían de otros V_H s en que los mismos tenían un aminoácido cargado positivamente en la posición 105 en lugar de una Gln (**Tabla 1; Figura 2**). No obstante, si bien el aminoácido con carga positiva en HVHP44 se adquiría por mutación, el de HV_HB82 estaba codificado en la línea germinal. Excepto en lo que respecta a HVHP423 y HVHP44B, los V_H s restantes tenían los residuos de la línea germinal en las posiciones de solubilidad principales: 37V/44G/45L/47W o 37F/44G/45L/47W (HVHP428; HVHP423 y HVHP44B tenían una mutación V37F. Las mutaciones en otras posiciones que se demuestra o se supone son importantes en la solubilidad de V_H incluían siete E6Q, tres S35T/H, una R83G y una K83R, una A84P y una T84A y una M108L. Se observaban también mutaciones frecuentes en las posiciones 1 y 5 que incluían once E1Q, ocho L5V/Q y una mutación V5Q.

Caracterización biofísica de los V_H s humanos

Todos los V_H s excepto HVHP44B, que era esencialmente el mismo que HVHP423, se expresaban en volúmenes de cultivo de 1 litro en la cepa TG1 de *E. coli* en fusión con el marcador c-Myc-His5 y se purificaron hasta homogeneidad de extractos periplásmicos por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). Los rendimientos de expresión oscilaban desde 1,8 a 62,1 mg de proteína purificada por litro de cultivo bacteriano en matraces de sacudidas, teniendo la mayoría de los V_H s rendimientos de varios miligramos (Tabla 2). En el caso de HVHP423 y HVHP430, otra prueba en condiciones de expresión "aparentemente" iguales dieron rendimientos de 2,4 y 6,4 mg frente 62,1 y 23,7 mg, respectivamente. Esto implica que para muchos de los V_H s descritos en esta memoria deberían alcanzarse condiciones de expresión óptimas, sin mucho esfuerzo, dando como resultado rendimientos de expresión significativamente mayores que los valores consignados en la Tabla 2. Como era de esperar, la totalidad de los V_H s se fijaban a la proteína A en análisis de resonancia de plasmones de superficie (SPR), con KDs de 0,2-3 μ M, un intervalo y magnitud comparables a los consignados previamente para variantes de V_H H de llama con actividad de fijación de proteína A. Ninguno de los V_H s se fijaba a la superficie de referencia de Fab.

La tendencia a la agregación de los V_H s humanos se evaluó en términos de sus estados de oligomerización por cromatografía de filtración en gel y NMR (Tabla 2). Todos los V_H s se sometieron a cromatografía de filtración en gel Superdex 75. Análogamente a un V_H s de llama, es decir, H11C7, todos los V_H s daban un soplo pico simétrico para el volumen de elución esperado para un monómero, y estaban sustancialmente exentos de cualesquiera agregados (véase el ejemplo para HVHP428 en la Figura 3A). En contraste, un V_H humano típico (a saber, BT32/A6) formaba una cantidad considerable de agregados. Para tres de los V_H s, se observó también un pico menor con una movilidad esperada para un dímero de V_H . Los análisis SPR de los picos menores daban valores de tasa de disociación que eran significativamente más lentos que los correspondientes a los V_H s monómeros, consistentes con el hecho de que se trataba de dímeros. El pico del dímero se observó también en el caso del V_H H de llama, H11C7. Los estados de plegado y oligomerización de los V_H s a concentraciones altas se estudiaron ulteriormente por espectroscopia NMR. Como se muestra en la Tabla II, todas las proteínas V_H estudiadas parecían ser relativamente solubles y asumían una estructura tridimensional bien plegada. Los espectros NMR unidimensionales de los fragmentos V_H

(Fig. 3B) exhibían pliegues estructurales característicos de dominios V_H . El estado de agregación de las proteínas se evaluó también por el uso de un experimento de difusión PFG-NMR para el fragmento HVHP414 y dos isoformas, V_H14 y V_H14 -cMyc- con y sin la secuencia c-Myc, del HVHP414. V_H14 es una versión modificada de HVHP414 con una mutación c-Myc N132E y con un residuo metionina adicional en el término N. En resumen, los datos PFG-NMR (no presentados) indicaban que todas las muestras de proteína tenían los pesos moleculares monómeros esperados incluso a las concentraciones de proteína relativamente altas utilizadas para los experimentos NMR.

Se investigó ulteriormente la estabilidad de los V_{HS} en términos de su resistencia a tripsina respecto a la integridad a 37°C después de incubaciones largas a 37°C. La tripsina escinde las cadenas principales amídicas de los polipéptidos en el término C de un residuo Arg o Lys. Existen 9-13 residuos Arg y Lys en los V_{HS} humanos (**Figura 2**). Existe también un residuo Lys adicional en el marcador c-Myc del terminal C que es sensible a la digestión por tripsina. La **Figura 4a** es un análisis SDS-PAGE de HVHP414 durante la digestión con tripsina. En el transcurso de una hora, la banda original se convertía completamente en un producto simple que tenía una movilidad esperada para el V_H sin marcador c-Myc-His₅ alguno. Se obtuvo el mismo resultado para otros 12 V_{HS} después de una incubación de una hora con tripsina. La espectrometría de masas en una muestra seleccionada al azar de los V_{HS} tratados con tripsina (a saber, HVHP414, HVHP419, HVHP420, HVHP423, HVHP429, HVHP430 y HVHM81) confirmó que en todos los casos la masa molecular del producto digerido correspondía a un V_H con el c-Myc Lys como el residuo C-terminal. HVHM41 daba un fragmento significativamente más corto que el resto después de digestión, y en este caso los experimentos de espectrometría de masas mapeaban el sitio de escisión al Arg 99 en CDR3 (datos no presentados).

Once V_{HS} comprendidos en concentración desde 0,32 mg/ml (HVHP428) hasta 3,2 mg/ml (HVHP420) se incubaron a 37°C durante 17 días. Su estabilidad se determinó subsiguientemente en términos de estado de oligomerización y fijación de proteína A. Como se demostró por cromatografía de permeación en gel, el tratamiento de V_{HS} a 37°C no producía formación alguna de agregados: todos los V_{HS} daban perfiles de cromatograma que eran virtualmente idénticos a los de V_{HS} sin tratar y se mantenían esencialmente como monómeros (véase el ejemplo para HVHP420; **Figura 4c**). Para asegurar que los V_{HS} mantenían su plegamiento nativo después del tratamiento a 37°C, se seleccionaron al azar dos V_{HS} , a saber, HVHP414 (1,2 mg/ml) y HVHP420 (3,2 mg/ml), y se determinaron sus K_{DS} de fijación a la proteína A por SPR (datos presentados para HVHP420; recuadro en la **Figura 4c**) y se compararon con los K_{DS} obtenidos para V_{HS} sin tratar (Tabla 2). Los K_{DS} calculados para los V_{HS} tratados térmicamente eran 1,4 μ M y 1,0 μ M para HVHP414 y HVHP420, respectivamente. Estos valores son esencialmente idénticos a los valores correspondientes para los V_{HS} sin tratar (Tabla 2), demostrando que el tratamiento de V_{HS} a 37°C no afectaba a su plegamiento nativo. La posibilidad de que los V_{HS} puedan haber estado en un plegamiento no nativo menos compacto durante los periodos de incubación a 37°C y hayan adquirido nuevamente su plegamiento nativo después de volver a la temperatura ambiente durante los experimentos de filtración en gel y SPR es poco probable en vista del hecho de que los V_{HS} eran resistentes a tripsina a 37°C (véase arriba), una propiedad asociada típicamente para proteínas nativas bien plegadas.

La eficiencia de repliegado (*RE*) de los V_{HS} humanos se investigó por comparación de los valores K_{DS} de la fijación de los V_{HS} nativos (K_{Dn}) y los repliegados y tratados térmicamente (K_{Dref}) a la proteína A (**Tanha, J. et al., 2002**). Cuando se desactiva una fracción del V_H por tratamiento térmico, el valor K_D medido sería mayor, dado que este parámetro está basado en la concentración de fragmento de anticuerpo plegado, es decir, activo. Así, la ratio de K_{Dn} a K_{Dref} da una medida de la *RE* de V_H . La **Figura 5** compara sensogramas para fijación de HVHP423 a proteína A inmovilizada en estados nativo (líneas gruesas) y repliegado (líneas delgadas) para varias concentraciones de V_H seleccionadas. Como puede verse, la fijación del V_H repliegado a la proteína A es menor en todos los casos, lo que indica que el desplegado no es totalmente reversible. Para cada uno de los 14 V_{HS} , se midió la fijación a la proteína A en ambos estados nativo y repliegado a varias concentraciones, y se determinaron los valores K_{DS} y subsiguientemente *REs* (**Tabla 2**, no se muestran los valores K_{Dref}). Se determinaron también los valores K_{DS} y *REs* de dos V_{HS} anti-idiotípicos de llama, H11F9 y H11B2, que se utilizaron como referencias. Cuatro V_{HS} tenían *REs* en el intervalo de 92%-95%, similares a las *REs* para H11F9 y H11B2, 95% y 100%, respectivamente. Otros cinco tenían *REs* en el intervalo de 84%-88% y tres superiores a 70%. Únicamente dos tenían *RE* significativamente menor: HVHP413 (52%) y HVHP421 (14%). Varios V_{HS} publicados examinados con anterioridad tenían *RE* próxima a 50% (**van der Linden, R.H. et al., 1999**).

Construcción y lavado en batea de bibliotecas de presentación de fago V_H humanas. Se sintetizó cDNA a partir de mRNA de bazo humano (Ambion Inc., Austin, TX) utilizando iniciadores hexanucleotídicos aleatorios y el kit de DNA de la Primera Cadena™ (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canadá). Utilizando los cDNAs como molde, genes de V_H con secuencias C_H flanqueantes se amplificaron por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en nueve reacciones separadas utilizando iniciadores específicos de la región de entramado 1 (FR1) de V_H y un iniciador específico de inmunoglobina M (**de Haard, H.J. et al., 1999**). Los productos se purificaron en gel y se utilizaron como el molde en la segunda tanda de PCR para construir genes de V_H utilizando los iniciadores específicos de FR1 y FR4 (**de Haard, H.J. et al., 1999**) que introdujeron también sitios de restricción flanqueantes *ApalI* y *NotI* para propósitos de clonación. Los DNAs resultantes del repertorio V_H se clonaron en el vector de fago fd-tetGIIID y se construyó una biblioteca de presentación de fago de V_H (**Tanha, J. et al., 2001**). El lavado en batea contra proteína A (Amersham Biosciences Inc.) se realizó como ha sido descrito (**Tanha, J. et al., 2001**). La asignación de secuencias de la línea germinal de los V_{HS} seleccionados se realizó utilizando el software DNAPLOT, Version 2.0.1 y

V BASE Version 1.0. (<http://vbase.dnplot.de/cgi-bin/vbase/vsearch.pl>). Se aislaron los V_HHs de llama H11C7, H11F9 y H11B2 de una biblioteca de presentación de fagos V_HH de llama por lavado en batea contra H11 scFv como se ha descrito (Tanha, J. *et al.*, 2002).

5 **Expresión y purificación de V_H**. Se clonaron V_Hs en vectores de expresión pSJF2 por técnicas estándar de clonación (Sambrook, J. Fritsch E.F. y Maniatis P, 1989). La expresión periplásmica de sdAbs y la purificación subsiguiente por cromatografía de afinidad metálica inmovilizada (IMAC) se realizaron como se ha descrito (Muruganandam, A. *et al.*, 2002). Las concentraciones de proteínas se determinaron por medidas de A₂₈₀ utilizando los coeficientes de absorción molar calculados para cada proteína (Pace, C.N. *et al.*, 1995). La cromatografía de filtración en gel de los V_Hs purificados se realizó en una columna Superdex 75 (GE Healthcare) como ha sido descrito (Deng, S.J. *et al.*, 1995).

10 **Experimentos de eficiencia de fijación y replegado**. Las constantes de disociación de equilibrio (K_{Ds}) y las eficiencias de replegado (REs) de V_Hs/ V_HHs se derivaron de datos de resonancia de plasmones de superficie (SPR) recogidos con el sistema biosensor BIACORE 3000 (Biacore Inc., Piscataway, NJ). Para medir la fijación de V_Hs a la proteína A, se inmovilizaron 2000 unidades de resonancia (RUs) de proteína A o un fragmento de fijación de antígeno (Fab) de referencia sobre chips sensores CM5 de grado investigación (Biacore Inc.). Las inmovilizaciones se realizaron a concentraciones de 25 µg/ml (proteína A) o 50 µg/ml (Fab) en tampón de acetato de sodio 10 mM de pH 4,5, utilizando el kit de acoplamiento de aminas proporcionado por el fabricante. Para medir la fijación de los V_HHs anti-idiotípicos de llama a H11 scFv, se inmovilizaron 4100 RUs de H11 scFv de 50 µg/ml o 3000 Rus de Se1554 IgG de referencia de 10 µg/ml, como se ha descrito arriba. En todos los casos, los análisis se realizaron a 25°C en HEPES 10 mM, de pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,005% de P20 a un régimen de flujo de 40 µl/min, y las superficies se regeneraron por lavado con el tampón de desplazamiento. Para determinar las actividades de fijación de las proteínas replegadas, se desnaturalizaron V_Hs o V_HHs por incubación a 85°C durante 20 min a concentraciones de 10 µg/ml. Las muestras de proteína se enfriaron luego a la temperatura ambiente durante 30 min y se replegaron y centrifugaron subsiguientemente en una microcentrífuga a 14000 rpm durante 5 min a la temperatura ambiente para eliminar cualesquiera precipitados de proteína. Se recuperaron los sobrenadantes y se analizaron respecto a actividad de fijación por SPR como se ha descrito arriba. Tanto para las proteínas plegadas como para las replegadas, se ajustaron los datos a un modelo de interacción 1:1 simultáneamente utilizando software BIAevaluation 4.1 (Biacore Inc.) y se determinaron subsiguientemente los valores K_{Ds} . Los valores REs se determinaron a partir de

$$RE = \frac{K_{Dn}}{K_{Dref}} \times 100$$

30

donde K_{Dn} es el valor K_D de la proteína nativa y K_{Dref} es el valor K_D de la proteína replegada.

35 **Experimentos de digestión con tripsina**. Se añadieron 3 µl de una tripsina de grado secuenciación de 0,1 µg/ml recién preparada (Hoffmann-La Roche Ltd., Mississauga, ON, Canadá) en HCl 1 mM a 60 µg de V_H en tampón Tris-HCl 100 mM de pH 7,8. Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen total de 60 µl durante 1 hora a 37°C y se pararon por adición de 5 µl de inhibidor de tripsina de 0,1 µg/µl (Sigma, Oakville, ON, Canadá). Una vez completada la digestión, se retiraron 5 µl y se analizaron por SDS-PAGE; el resto se desaló utilizando ZipTip_{C4} (Millipore, Nepean, ON, Canadá), se eluyó con ácido acético al 1% en metanol:agua 50:50 y se sometió a determinación de la masa de V_H por espectrometría de masas MALDI.

40 **Estudios de estabilidad de las proteínas a 37°C**. Anticuerpos mono-dominio (sdAbs) a concentraciones de 0,32-3,2 mg/ml se incubaron a 37°C en tampón PBS durante 17 días. Después de la incubación, las muestras de proteína se centrifugaron en una microcentrífuga a la velocidad máxima durante 5 min incluso en ausencia de cualquier formación visible de agregados. Las muestras se aplicaron luego a una columna de exclusión por tamaños Superdex 75 (GE Healthcare) y los picos de monómero se recogieron para análisis SPR contra proteína A. Los análisis SPR se efectuaron como se ha descrito arriba excepto que se inmovilizaron 500 RUs de proteína A o Fab de referencia y que las inmovilizaciones se realizaron a concentración de 50 µg/ml.

45 **Experimentos NMR**. Muestras de V_H para análisis NMR se disolvieron en fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, y NaN₃ al 0,02% a pH 7,0. Las concentraciones de proteína eran 40 µM-1,0 mM. Todos los experimentos NMR se realizaron a 298 K en un espectrómetro Bruker Avance-800 o Bruker Avance-500 NMR. Los espectros ¹H NMR unidimensionales (1D) se registraron con 16384 puntos de datos y las anchuras espectrales eran 8992,81 Hz a 500 MHz y 17605,63 Hz a 800 MHz, respectivamente. Se adquirieron espectros ¹H-¹H-NOESY bidimensionales de 2048 x 400 puntos de datos en un espectrómetro Bruker Avance-800 NMR con una anchura espectral de 11990,04 Hz y un tiempo de mezcla de 120 ms. En todos los experimentos NMR, la supresión del agua se consiguió utilizando el método WATERGATE implementado por el tren de impulsos 3-9-19 (Piotto, M. *et al.*, 1992; Sklenar, V. *et al.*, 1993). Los datos NMR se procesaron y analizaron utilizando el paquete de software Bruker XWINNMR. Todas las medidas de difusión PFG-NMR se realizaron con la secuencia LED previa supresión del agua (Altieri, A.S. *et al.*, 1995), en un espectrómetro Bruker Avance-500 NMR, equipado con una sonda de resonancia

55

triple con gradientes triaxiales. Los espectros unidimensionales de protones se procesaron y analizaron utilizando el paquete de software Bruker XWINNMR. Las intensidades de las señales NMR se obtuvieron por integración de los espectros NMR en la región de los protones de metilo y metileno (2,3 ppm a -0,3 ppm), donde todas las señales NMR se atenúan uniformemente para todas las concentraciones de PFG dadas.

5 **Construcción y lavado en batea de bibliotecas de presentación de fago humanas V_L .** Se sintetizaron cDNAs a partir de mRNA de bazo humano como se ha descrito arriba para los V_{HS} humanos. Se utilizó el cDNA como molde en la PCR para amplificar los genes V_L en volúmenes de reacción de 50 μ l utilizando seis iniciadores V_K inversos, once iniciadores V_λ inversos (de Haard, H.J. *et al.*, 1999), cuatro iniciadores V_K directos y dos iniciadores V_λ directos (Sblattero, D. *et al.*, 1998). Los iniciadores inversos y directos se modificaron de modo que tuvieran sitios de restricción flanqueantes *Apa* LI y *Not* I, respectivamente, para propósitos de clonación subsiguientes. Los iniciadores directos se agruparon en ratios que reflejaban su grado de degeneración. Los genes V_λ se sometieron a PCR en once reacciones separadas utilizando los iniciadores directos V_λ agrupados y once iniciadores inversos V_λ individuales. Análogamente, los genes V_λ se amplificaron en seis reacciones separadas utilizando los iniciadores directos V_K agrupados y seis iniciadores inversos V_λ individuales. Los productos PCR se agruparon, se purificaron en gel y se digirieron con las endonucleasas de restricción *Apa* LI y *Not* I. La biblioteca se construyó como se describe para los V_{HS} humanos. La PCR de las calvas se realizó sobre colonias de bibliotecas individuales y los genes V_L amplificados se secuenciaron como se ha descrito (Tanha, J. *et al.*, 2003). El lavado en batea contra la proteína L (Biolynx Inc., Brockville, ON, Canadá) y la asignación de la secuencia de la línea germinal de los V_{HS} seleccionados se realizaron como se ha descrito arriba para la biblioteca V_H humana.

20 **Expresión y purificación de V_L .** La expresión, purificación, determinación de la concentración y cromatografía de filtración en gel de V_L se realizaron como se ha descrito para V_{HS} en "expresión y purificación de V_H ".

25 **Expresión y purificación de pentámeros de V_L y V_H .** Se utilizaron iniciadores específicos en una PCR para amplificar los genes HVHP328 V_H y HVLP335 V_L . Se utilizaron técnicas estándar de clonación para clonar los genes HVHP328 y HVLP335 en fusión con el gen del dominio de pentamerización VT1B en un vector de expresión para producir pentámeros HVHP328PVT2 y HVLP335PTV2, (Zhang, J. *et al.*, 2004). Los pentámeros se expresaron y purificaron como se ha descrito (Zhang, J. *et al.*, 2004). Las concentraciones de proteína se determinaron como anteriormente.

30 **Resonancia de plasmones de superficie de V_L s.** Las cinéticas de fijación para la interacción de los V_L s a la proteína L se determinaron por SPR utilizando el sistema biosensor BIACORE 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). 680 RUs de proteína L u 870 RUs de una referencia Fab se inmovilizaron sobre chips sensores CM5 de grado investigación (Biacore). Las inmovilizaciones se llevaron a cabo a una concentración de proteína de 50 μ g/ml en tampón de acetato 10 mM de pH 4,5 utilizando el kit de acoplamiento de aminas suministrado por el fabricante. Todas las medidas se realizaron a 25°C en tampón HEPES 10 mM de pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,005% de P20 a un régimen de flujo de 50 μ l/min o 100 μ l/min. Las superficies se regeneraron por lavado con el tampón de desplazamiento. Los datos se evaluaron utilizando el software BIAevaluation 4.1 (Biacore, Inc.).

40 **Resonancia de plasmones de superficie de los pentámeros de V_L y V_H .** Se determinaron también por SPR las cinéticas de fijación para la interacción de HVHP328PVT2 con proteína A y HVLP335PTV2 con proteína L. Se inmovilizaron como anteriormente 520 RUs de proteína A o una Fab de referencia. Para el pentámero de V_L , se utilizaron las mismas superficies preparadas anteriormente. Las medidas se efectuaron como anteriormente pero a un régimen de flujo de 20 μ l/min. Las superficies se regeneraron por lavado con HCl 50 mM durante 3 s. Los datos se evaluaron como se ha descrito para los monómeros.

Microaglutinación de células

45 Se utilizó una sola colonia de *S. aureus* de una placa BHI para inocular 15 ml de medio BHI. Las bacterias se dejaron crecer durante una noche a 37°C a 200 rpm. A la mañana siguiente, se centrifugó el cultivo en una centrífuga Sorvall RT6000B refrigerada de cubeta oscilante a 4000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en tampón PBS. Se centrifugaron de nuevo las células, se retiró el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió de nuevo en tampón PBS. Se diluyeron las células a un valor A_{600} de 1,0, y se extendieron diluciones en serie de las células en placas BHI a 37°C para crecimiento durante la noche. A la mañana siguiente se determinó el título de células. Un valor A_{600} de 1,0 correspondía a $1,5 \times 10^9$ células ml^{-1} . Se dieron pasos idénticos para preparar células de la cepa TG1 de *E. coli* para ensayos subsiguientes de microaglutinación, excepto que el medio de crecimiento era 2 x YT. Los recuentos viables fueron similares, A_{600} 1,0 = $2,1 \times 10^9$ células ml^{-1} .

55 Para realizar los ensayos de microaglutinación, se realizaron diluciones al doble de HVHP328PVT2 en PBS de los pocillos 1 a 11 en una placa de microtitulación. El pocillo 12 (blanco) tenía únicamente PBS. El volumen total en cada pocillo era 50 μ l. Subsiguientemente, se añadieron 1×10^8 células de *S. aureus* en 50 μ l de PBS a todos los pocillos, y la placa se incubó durante una noche a 4°C. Para lograr un registro permanente de los resultados, se tomó una fotografía de la placa durante la mañana. Para el experimento de control de pentámeros, se reemplazó

HVHP328PVT2 con el pentámero de V_L , HVLP335PTV2. En los experimentos de control de células, se repitieron las dos mismas series de experimentos con células TG1 de *E. coli*.

Identificación y análisis de la secuencia de los V_L s humanos monómeros

Se aplicó esencialmente el mismo método de selección empleado para aislar V_{HS} solubles a partir de una biblioteca de presentación de fago V_H humana a una biblioteca humana de V_L para aislar los V_L s solubles monómeros. Se construyó una biblioteca de V_L humana con un tamaño de 3×10^6 . Se seleccionaron veinticuatro calvas de las placas de titulación de la biblioteca y sus genes V_L se sometieron a PCR y se secuenciaron. Las secuencias eran diversas en términos de origen de la línea germinal, aunque el 75% de los V_L s eran de origen $V\lambda$ (datos no presentados). Tres tandas de lavado en batea contra la proteína L dieron como resultado el enriquecimiento de calvas grandes. Treintinueve de las calvas grandes se secuenciaron y se identificaron treinta y dos secuencias singulares (**Figura 6**). HVLP325, HVLP335 y HVLP351 aparecían con frecuencia de 3, 4 y 2, respectivamente. Excepto HVLP389 que es de la clase lambda (subgrupo $V\lambda 1$, línea germinal 1b), los 31 V_L restantes pertenecían a la clase V_k . De los 31 V_L s Kappa, 24 caen dentro del subgrupo V_{kIII} y 7 dentro del subgrupo V_{k1} . Dieciséis de las 24 secuencias V_{kIII} utilizan la secuencia de línea germinal L6, utilizando las restantes las secuencias de línea germinal A27, L2 y L6. Los V_L s del subgrupo V_{k1} se originan a partir de la secuencia de línea germinal O2/O12 o A30. En la posición 96 se producían mutaciones notables. Los aminoácidos de la línea germinal en esta posición son aminoácidos aromáticos e hidrófobos Trp, Phe, Tyr, Leu o Ile para V_L s kappa y Tyr, Val o Ala para los V_L s lambda. Pero en la agrupación seleccionada de V_L s kappa únicamente 5 de 31 tienen sus aminoácidos de la línea germinal en la posición 96: HVLP325, HVLP349, HVLP388, HVLP3109 y HVLP393. Veintiún aminoácidos en la posición 96 están cargados, de los cuales 20 tienen carga positiva: Arg, Lys o His. Dos aminoácidos son Pro, uno Gln, uno Ser y uno Thr. De siete V_L s kappa analizados por cromatografía de filtración en gel respecto a carácter monómero, seis que tenían Arg o Lys en la posición 96 eran también monómeros, en tanto que HVLP325 con el aminoácido Leu de la línea germinal en la posición 96 formaba agregados (véase más adelante). Análogamente, HVLP389 que era de la clase lambda y tenía una mutación de la línea germinal a Ser era también monómero (véase más adelante). Estos datos correlacionan la desviación de los aminoácidos de la línea germinal en la posición 96 (27 de 32) con propiedades biofísicas mejoradas de V_L s tales como el carácter monómero.

Dieciocho V_L s de la clase kappa tenían sus tres últimos residuos (105-107) reemplazados con aminoácidos Thr, Val y Leu que se encuentran únicamente en los V_L s lambda. Estas sustituciones pueden haber tenido un papel en la mejora de las propiedades biofísicas de los V_L s kappa, dando como resultado la selección de los V_L s mencionados anteriormente sobre los clones parentales con los residuos kappa originales en la posición 105-107.

Caracterización de los V_L s humanos

Ocho de los V_L s seleccionados con orígenes diferentes de la línea germinal V se expresaron en *E. coli* en cultivos de 1 litro y se purificaron: HVLP324, HVLP325, HVLP335, HVLP342, HVLP351, HVLP364, HVLP389 y HVLP3103 (Tabla 6). Todos ellos se expresaban con buenos rendimientos comprendidos entre 6,2 mg para HVLP324 y alrededor de 75 mg para HVLP335 y HVLP364.

La tendencia a la agregación de los V_L s humanos se evaluó en términos de su estado de oligomerización por cromatografía de filtración en gel. Los V_L s se sometieron a cromatografía de filtración en gel Superdex 75 a una concentración de 0,6 mg/ml. Todos excepto HVLP325 estaban esencialmente exentos de agregados y daban picos simples simétricos con el peso molecular medio aparente de 12,7 kDa (intervalo, 6,2-19,2 kDa) (**Figura 7a y Tabla 3**). Esto está de acuerdo con la masa molecular esperada para V_L s monómeros, 13,4-13,8 kDa. La variación de masa molecular aparente para anticuerpos mono-dominio ha sido consignada previamente (Jespers, L. *et al.*, 2004a; Stevens, F.J. *et al.*, 1980). Para HVLP325, los agregados formaban 11% de la proteína total (agregado más monómero). HVLP351, HVLP342, HVLP335 y HVLP3103 eran todavía monómeros cuando se testaron a su máxima concentración disponible, a saber, 0,89 mg/ml, 1,0 mg/ml, 4,9 mg/ml y 5,9 mg/ml, respectivamente (**Figura 7B**).

Se sometieron los V_L s a cromatografía con Superdex-75 antes del análisis BIACORE y los picos de monómero purificados se recogieron incluso en ausencia de cualquier evidencia de material agregado. En el análisis SPR, todos los V_L s seleccionados se fijaban a proteína L (**Figura 8**). Esto no era inesperado, dado que los V_L s se aislaron por lavado en batea contra proteína L. Para todos ellos, los valores K_{DS} de fijación a proteína L estaban comprendidos entre 0,6 y 3 μ M (Tabla 3). HVLP324 y HVLP342 tenían valores K_{DS} adicionales más pequeños, 10 nM y 40 nM, respectivamente. Las fijaciones de afinidad baja y de afinidad alta de los V_L s del subgrupo V_{k1} a la proteína L han sido consignadas previamente (referencia). Ambos, HVLP324 y HVLP342, pertenecen al subgrupo V_{k1} (**Tabla 3**). Como era de esperar, los datos cinéticos y de equilibrio eran consistentes con el hecho de que pico monómero fuera realmente monómero.

Análisis de fijación de pentámeros

Las fijaciones del pentámero HVHP328PVT2 a proteína A y del pentámero HVLP335PTV2 a proteína L se determinaron por resonancia de plasmones de superficie (**Figura 9**). Las tasas de asociación se calcularon independientemente a partir de gráficas de K_{obs} frente a la concentración. Pudo calcularse más de una tasa de

disociación (k_d) debido a la heterogeneidad en fijación multivalente entre la población de pentámeros. Por esta razón, pudo obtenerse más de una constante de disociación de equilibrio, K_D . HVHP328PTV2 y HVLP335PTV2 tenían valores K_D s mínimos de 2 mM y 200 pM, respectivamente (**Tabla 4**). Con K_D s más lentas, HVHP328PTV2 y HVLP335PTV2 tenían valores K_D s tan bajos como 900 y 90 pM, respectivamente.

5 Detección de patógenos por V_L s y V_H s

La actividad de fijación a proteína A y L de los V_H s y V_L s puede utilizarse para detectar bacterias que tienen proteína A y/o L en sus superficies. Esto es posible si los V_H s y V_L s son solubles y monómeros (falta de tendencia a agregarse) tales como los V_H s y V_L s de esta invención. Los dominios variables derivados de anticuerpos que carecen de cadenas ligeras tales como los anticuerpos de cadena pesada de Camélidos o los IgNARs de tiburón nodriza o tiburón alfombra son naturalmente solubles y monómeros. De éstos, los que poseen actividad de fijación a proteína A y L pueden utilizarse también para detectar bacterias que tienen proteína A y/o L en sus superficies. La proteína A está presente en la superficie de las bacterias patógenas, *Staphylococcus aureus*. Así, los V_H s con actividad de fijación a proteína A tales como los descritos en esta memoria pueden utilizarse para detectar *S. aureus*. Los inventores realizaron un ensayo de microaglutinación para detectar la capacidad del pentámero de V_H HVHP328PVT2 para fijarse a *S. aureus*. Se incubaron un número constante de células bacterianas con diluciones al doble de HVHP328PVT2 en pocillos de microtitulación (pocillos 1-11) (**Figura 10**). El pocillo 12 contenía tampón en lugar del pentámero. Si los V_H s se fijan a las células bacterianas, entonces el pentámero, debido a su naturaleza multímera, debería ser capaz de reticular las células y dar como resultado aglutinación celular. Las células aglutinadas aparecerán como células difusas en un pocillo de microtitulación (**Figura 10**). En ausencia de cualquier fijación, no ocurriría aglutinación alguna, es decir ausencia de aglutinación, y las células aparecerán como una mancha en el fondo del pocillo. Como se muestra en la Figura 10, el pentámero se fija al *S. aureus*, dado que existe aglutinación de células. La aglutinación se observa hasta el pocillo 7. Más allá del pocillo 7, la concentración del pentámero es demasiado baja para la fijación, por lo que no se produce ya aglutinación alguna. El pentámero de control V_L no exhibe aglutinación alguna, demostrando la especificidad del pentámero V_H para *S. aureus* (**Figura 10**). La fijación es también específica en cuanto a las células, dado que el pentámero V_H , como era de esperar, no aglutina células de *E. coli* (cepa TG1) o de *Salmonella* (datos no presentados). Análogamente, los monómeros de V_L y pentámeros de V_L con actividad de fijación para proteína L pueden utilizarse para la detección de bacterias, en particular bacterias patógenas tales como *Peptostreptococcus magnus*, que tienen proteína L en la superficie de sus células.

30

Lista de referencias

- Bai, Y. y Feng, H. (2004). Selection of stably folded proteins by phage-display with proteolysis. *Eur.J.Biochem.* 271: 1609-1614.
- 5 Davies, J. y Riechmann, L. (2-21-1994). 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains. *FEBS Lett* 339: 285-290.
- Davies, J. y Riechmann, L. (1995). Antibody VH domains as small recognition units. *Biotechnology N.Y.* 13: 475-479.
- de Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruine, A. P., Arends, J. W., y Hoogenboom, H. R. (6-25-1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J.Biol.Chem.* 274: 18218-18230.
- 10 Deng, S. J., MacKenzie, C. R., Hirama, T., Brousseau, R., Lowary, T. L., Young, N. M., Bundle, D. R., y Narang, S. A. (5-23-1995). Basis for selection of improved carbohydrate-binding single-chain antibodies from synthetic gene libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 92: 4992-4996.
- Forrer, P., Jung, S., y Pluckthun, A. (1999). Beyond binding: using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 9: 514-520.
- 15 Fournier, B. y Klier, A. (2004). Protein A gene expression is regulated by DNA supercoiling which is modified by the ArlS-ArlR two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 150: 3807-3819.
- Hamers, C. C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., y Hamers, R. (6-3-1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448.
- 20 Jaspers, L., Schon, O., Famm, K., y Winter, G. (2004a). Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. *Nat.Biotechnol.* 22: 1161-1165.
- Jaspers, L., Schon, O., James, L. C., Veprintsev, D., y Winter, G. (4-2-2004b). Crystal Structure of HEL4, a Soluble, Refoldable Human V(H) Single Domain with a Germ-line Scaffold. *J.Mol.Biol.* 337: 893-903.
- Jung, S., Honegger, A., y Pluckthun, A. (11-19-1999). Selection for improved protein stability by phage display. *J.Mol.Biol.* 294: 163-180.
- 25 Matsuura, T. y Pluckthun, A. (3-27-2003). Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display. *FEBS Lett.* 539: 24-28.
- Muruganandam, A., Tanha, J., Narang, S., y Stanimirovic, D. (2002). Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J.* 16: 240-242.
- 30 Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., y Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4: 2411-2423.
- Ricci, S., Medaglini, D., Marcotte, H., Olsen, A., Pozzi, G., y Bjorck, L. (2001). Immunoglobulin-binding domains of peptostreptococcal protein L enhance vaginal colonization of mice by *Streptococcus gordonii*. *Microb.Pathog.* 30: 229-235.
- 35 Sambrook, J. F. E. F. a. M. T. (1989). "Molecular Cloning: A laboratory Manual (2nd ed.)", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY..
- Sblattero, D. y Bradbury, A. (1998). A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions. *Immunotechnology.* 3: 271-278.
- Tanha, J., Dubuc, G., Hirama, T., Narang, S. A., y MacKenzie, C. R. (5-1-2002). Selection by phage display of llama conventional V(H) fragments with heavy chain antibody V(H)H properties. *J.Immunol.Methods* 263: 97-109.
- 40 Tanha, J., Muruganandam, A., y Stanimirovic, D. (2003). Phage Display Technology for Identifying Specific Antigens on Brain Endothelial Cells. *Methods Mol.Med.* 89: 435-450.
- Tanha, J., Xu, P., Chen, Z. G., Ni, F., Kaplan, H., Narang, S. A., y MacKenzie, C. R. (7-6-2001). Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries. *J.Biol.Chem* 276: 24774-24780.
- 45 van der Linden, R. H., Frenken, L. G., de Geus, B., Harmsen, M. M., Ruuls, R. C., Stok, W., de Ron, L., Wilson, S., Davis, P., y Verrips, C. T. (4-12-1999). Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim.Biophys.Acta* 1431: 37-46.

Waldo, G. S. (2003). Genetic screens and directed evolution for protein solubility. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 7: 33-38.

Ward, E. S., Gussow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T., y Winter, G. (10-12-1989). Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli* [see comments]. *Nature* 341: 544-546.

5 Zhang, J., Li, Q., Nguyen, T. D., Tremblay, T. L., Stone, E., To, R., Kelly, J., y MacKenzie, C. R. (7-30-2004). A pentavalent single-domain antibody approach to tumor antigen discovery and the development of novel proteomics reagents. *J.Mol.Biol.* 341: 161-169.

Tabla 1. Desviaciones de secuencia de V_H respecto a las secuencias de la línea germinal parental

| V _H | Líneas germinales V/J | Desviación de aminoácidos de las secuencias de línea germinal V y FR4 |
|----------------|-----------------------|--|
| HVHP44 | DP47/JH4b | L5V, Q105R |
| HVHB82 | DP47/JH6c | E1Q, L5Q |
| HVHP421 | DP47/JH4b | E1Q, V2L, L5Q, L11V, G16R |
| HVHP419 | DP47/JH4b | E1Q, V2L, L5Q, T77S, R83G, K94R |
| HVHP430 | DP47/JH3b | E1Q, L5V, V12I, Q13K, S31N, G52AS, L78V, A93V, K94R |
| HVHP429 | DP47/JH4 | L5V, G10T, S30I, S31N, G42D, E46D, A50T, G52aN, S53N, S56A K75N, A84P, E85D |
| HVHM41 | DP47/JH3a | E1Q, L5V, E6Q, G16R, T28A, S53G, G55D, S56H, M108L |
| HVHM81 | DP47/JH3a | L5V, E6Q, G16R, S30D, S31D, S35H, A50G, G55A, E85G, V89L, K94R |
| HVHP428 | V3-49/JH4b | E1Q, V2L, V5Q, R16G, T23A, G30S, D31S, T60A, G73D, K83R, T84A, V89M, T93A |
| HVHP420 | DP-38/JH4b | E1Q, S35T, S52aT |
| HVHP414 | DP-38/JH3b | E1D, E6Q, A23T, T28P, K52T, A60V |
| HVHP423 | V3-53/JH1 | E1Q, V2M, E6Q, L11V, I12V, N32S, Y33R, V37F, K43M, K64R, T68S, V89L |
| HVHP44B | V3-53/JH1 | E1Q, E6Q, N32S, Y33R, V37F, K43M, Y58S, K64R, T68S, V89L |
| HVHP413 | YAC-5/JH3b | E1Q, E6Q, Q13K, V29F, S31D, N32Y, V50F |
| HVHP426 | 8-1B/JH3b | E1Q, E6Q, L11V, G16R, T28I, S30D, S31G, N32Y, Y33A, S35H, K43Q, I51T, Y52N, S53N, Y58S, L78V |

5 Tabla 2. Características biofísicas de los V_Hs humanos

| V _H /V _H H | Exp.# (mg) | K _D (μM) | Resistencia a tripsina | RE (%) |
|----------------------------------|------------|---------------------|------------------------|--------|
| HVHP44 | 8.2 | 1.3 | √ | 93 |
| HVHB82 | 5.9 | 0.2 | √ | 71 |
| HVHP421 | 5.5 | 1.0 | √ | 14 |
| HVHP419 | 3.4 | 1.6 | √ | 84 |
| HVHP430 | 6.4,23.7 | 2.3 | √ | 88 |
| HVHP429 | 3.4 | 1.3 | √ | 86 |
| HVHM41 | 1.8 | 0.5 | X | 92 |
| HVHM81 | 4.3 | 1.3 | √ | 87 |
| HVHP428 | 3.1 | 1.8 | √ | 95 |
| HVHP420 | 59.0 | 1.2 | √ | 92 |
| HVHP414 | 11.8 | 1.6 | √ | 73 |
| HVHP423 | 2.4,62.1 | 3.0 | √ | 86 |
| HVHP413 | 5.8 | 0.3 | √ | 52 |
| HVHP426 | 6.3 | 0.8 | √ | 70 |
| H11F9* | ND | 3.5 | ND | 95 |
| H11B2* | ND | 2.0 | ND | 100 |

Rendimiento de expresión por litro de cultivo bacteriano

* K_Ds y REs se determinaron contra H11 scFv.

Tabla 3. Características de los VLs humanos

| VL | Subgrupo | Expresión ^a | KD | Estado de oligomerización ^b |
|----------|----------|------------------------|------------------------|--|
| | | <i>mg</i> | <i>μM</i> | |
| HVLP324 | Vkl | 6,9 | 0,2, 0,01 ^c | Monómero |
| HVLP325 | VkIII | 6,2 | 1 | Monómero/Agregado |
| HVLP335 | VkIII | 73,5 | 2 | Monómero |
| HVLP342 | Vkl | 7,7 | 0,6, 0,04 ^c | Monómero |
| HVLP351 | VkIII | 8,9 | 2 | Monómero |
| HVLP364 | VkIII | 77,1 | 3 | Monómero |
| HVLP389 | VλI | 16,7 | 1 | Monómero |
| HVLP3103 | VkIII | 19,0 | 1 | Monómero |

^a Rendimiento de expresión por litro de cultivo bacteriano.

^b El estado de oligomerización se determinó por cromatografía de filtración en gel.

5 ^c Los valores K_D más pequeños corresponden a la fijación de HVLP324 y HVLP342 a los sitios de afinidad alta en la proteína L.

Tabla 4. Constantes cinéticas y de equilibrio para las fijaciones de HVHP328PTV2 y HVLP335PTV2 a proteína A y L, respectivamente

| Pentacuerpo | HVHP328PTV2 | HVLP335PTV2 |
|--------------------------|---------------------|----------------------|
| k_a ($M^{-1}s^{-1}$) | $4,3 \times 10^5$ | $1,7 \times 10^6$ |
| k_d (s) | $<1 \times 10^{-3}$ | $<4 \times 10^{-4}$ |
| K_D (M) | $<2 \times 10^{-9}$ | $<2 \times 10^{-10}$ |

10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA

5 <120> MÉTODO PARA AISLAMIENTO DE POLIPÉPTIDOS SOLUBLES

<130> JWW01397EP39

<140>

<141>

10

<150> 60/664,954

<151> 25-03-2005

<160> 55

15

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 122

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Val Ser Ser Asp
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Asn Ser Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Asp Leu Ala Tyr Cys Gly Gly His Cys Asp His Ser Pro Trp
100 105 110

25 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

30

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

ES 2 531 537 T3

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
 65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Leu Thr Gln Trp Ala Ala Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Gly Ile Ser Tyr Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp His Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Ala Ser Gly Arg Asp Asp Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

ES 2 531 537 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Glu Pro Arg Ser Val Ser Gly Leu Arg Gly Val Val Asp
 100 105 110
 Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 9
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Thr Asp Met Glu Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

10

<210> 10
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 10
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

ES 2 531 537 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Gly Lys Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Asp His Pro Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 11
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Gly Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Trp Ser Gly Ser Ser Tyr Gly Gly Asp Leu Asp Ser Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 12
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 12
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly

ES 2 531 537 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Asp His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Gly Met Val Arg Gly Val Ser Ser Ala Pro Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Ser Ile Thr Gly Pro Thr Gly Ala Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 16
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 16

ES 2 531 537 T3

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Lys Asp Gly Tyr Asn Ser Pro Glu Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 17
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Thr Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Asp Arg Asp His Ser Ser Gly Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 18
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 18

ES 2 531 537 T3

Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Thr Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Val Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Asp Gln Ala Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 19
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Arg Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
 50 55 60
 Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Arg Glu Gly Ala Val Thr Arg Glu Asp Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 20
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 20

ES 2 531 537 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Arg Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Arg
 50 55 60
 Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Arg Glu Gly Ala Val Thr Arg Glu Asp Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 21
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Ser Arg Val Gly Gly Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 22
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 22

ES 2 531 537 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Val Asp Gly Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Thr Asn Asn Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gln Ser Ile Thr Gly Pro Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 23
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Ser Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Cys Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

10

<210> 24
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 24

ES 2 531 537 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Ser Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 25
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10 <210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 26
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

ES 2 531 537 T3

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 29

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Gly Trp Pro Lys
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

10

<210> 30

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 30

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

ES 2 531 537 T3

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 33
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser His
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Arg Leu Ser
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 34
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 34
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Ser Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

15 <210> 35
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 35

ES 2 531 537 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Pro Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser His
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser His Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Tyr Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 36
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 36
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Asp Trp Pro Ser
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

10

<210> 37
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 37

ES 2 531 537 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
 35 40 45
 Phe Asp Thr Ser Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Gln Lys Arg Ser Ser Gly Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 38
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 38
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Arg Ser
 20 25 30
 Leu Val Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro His
 85 90 95
 Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 39
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 39
 Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

ES 2 531 537 T3

Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gly
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Pro Glu Thr Phe
 85 90 95

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 40

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 40

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Gly Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 41

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

ES 2 531 537 T3

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 46
 Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Thr Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Ser Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 47
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Thr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

15 <210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 48

ES 2 531 537 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 49
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 49
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 50
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

ES 2 531 537 T3

Asp Arg Val Thr Ile Pro Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Pro
 100 105

5 <210> 51
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Phe Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Gly Asn Ser
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Asn Pro Arg Leu Leu Val
 35 40 45

Ser Gly Gly Ser Phe Leu Gln Ser Gly Val Ser Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ala Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Thr Gly Leu Arg Leu
 65 70 75 80

Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ala Val Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Ser Val Leu
 100 105

10 <210> 52
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 52
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Thr Asp
 20 25 30

Leu Asp Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Arg Ala Pro His Arg Leu Ile

ES 2 531 537 T3

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Thr Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Leu Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 53

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Met Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

10

<210> 54

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 54

Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Tyr Asn Ile Gly Glu Asn
20 25 30

Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ES 2 531 537 T3

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Asn Leu
85 90 95

Arg Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 55

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Marcador 6xHis sintético

<400> 55

His His His His His His

1

5

15

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de anticuerpo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 48.
- 5 2. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el fragmento de anticuerpo es un V_L.
3. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2.
- 10 4. Un multímero que comprende el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2.
5. Un dímero que comprende el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2.
6. Un trímero que comprende el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2.
- 15 7. Un pentámero que comprende el fragmento anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2.
8. Un vector recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 3.
- 20 9. Una célula hospedadora transformada con el vector recombinante de la reivindicación 8.
10. Un método para producir una biblioteca de fragmentos de anticuerpo, que comprende:
- 25 a) proporcionar una secuencia de nucleótidos que codifica el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2;
- b) proporcionar secuencias de oligonucleótidos con codones aleatorizados;
- c) incorporar los oligonucleótidos aleatorizados en la secuencia de nucleótidos que codifica una o más de una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del fragmento de anticuerpo, de tal modo que una o más de una de las CDR está aleatorizada;
- d) expresar las secuencias de nucleótidos producidas en el paso c).
- 30 11. Uso de una biblioteca de fragmentos de anticuerpo obtenida por el método de la reivindicación 10, para someter a cribado las secuencias expresadas para fijación a un polipéptido diana.
12. El uso de la reivindicación 11, en donde el cribado comprende lavado en batea contra una molécula diana.
- 35

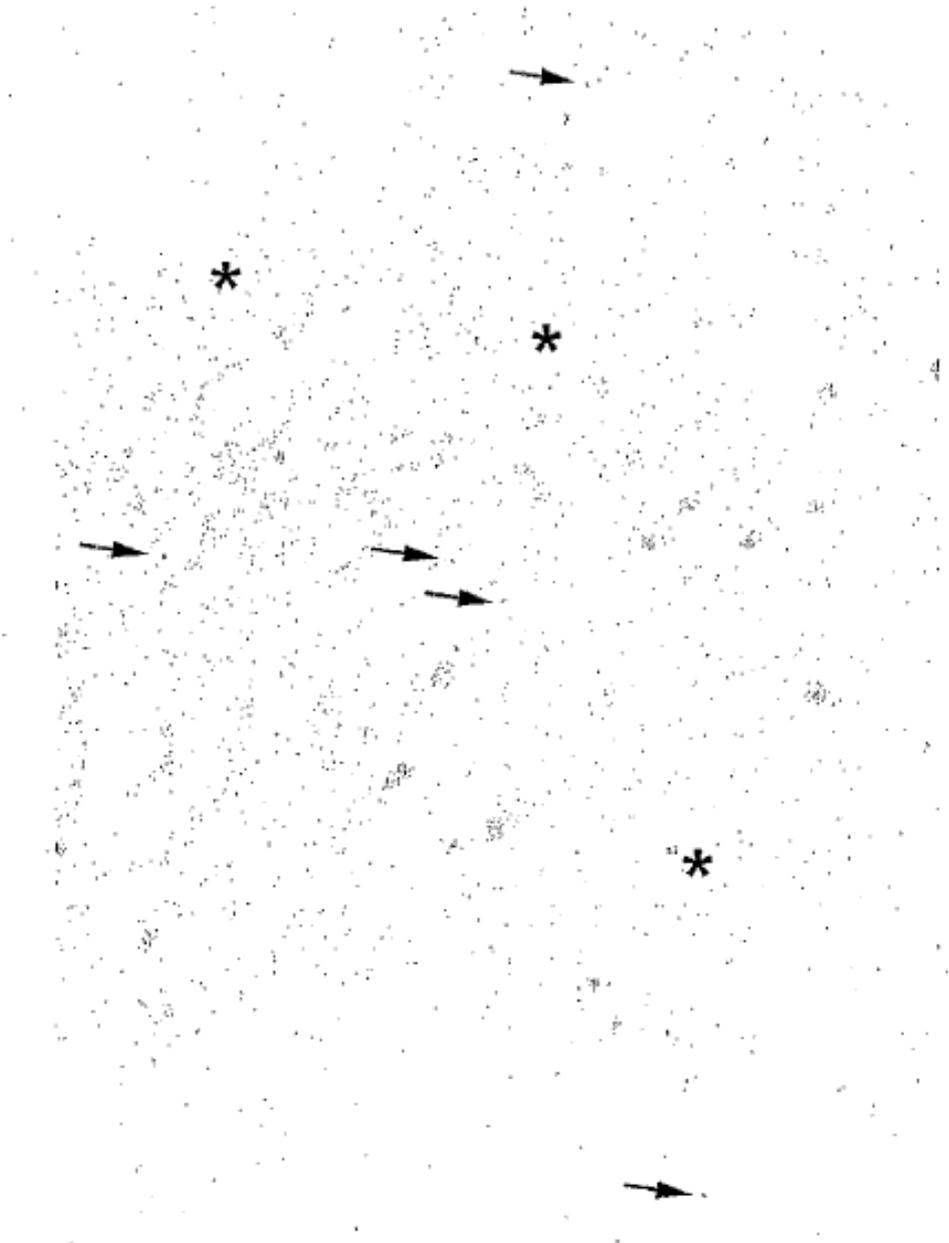


FIGURA 1

| | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | |
|---------|------------------------|-----------|---------------------|-----------------------|--|
| HVHP44 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS | CAASGFTFS | SYAMS WVRQAPGKLEWVS | AIISG--SGGSTYYADSVKG | |
| HVHB82 | Q...Q..... | | | | |
| HVHP421 | QL..Q....V...R..... | | | | |
| HVHP419 | QL..Q..... | | | | |
| HVHP430 | Q.....IK..... | N..... | | S--..... | |
| HVHP429 |T..... | I N..... | D..D.. | T..N--N..A..... | |
| HVHM41 | Q...Q.....R.....A.. | | | --G.DH..... | |
| HVHM81 |Q.....R.....D | D..H | | G...--A..... | |
| HVHP428 | QL..Q..... | | F..... | G F.RSKAY..T.E..A... | |
| HVHP420 | Q.....K..... | NAW.T | | G R.KTKTD..T.D..AP... | |
| HVHP414 | D...Q....K.....T...P.. | NAW.. | | G R.TSKTD..T.D.VAP... | |
| HVHP423 | QM...Q...V.....V.. | .SR.. | F...M..... | V.Y---.....R. | |
| HVHP44B | Q...Q....I.....V.. | .SR.. | F...M..... | V.Y---.....S...R. | |
| HVHP413 | Q...Q....K..... | D.Y.. | | F.Y---..... | |
| HVHP426 | Q...Q...V...R..... | IVD G...H | | VTN---N...S..... | |

| | FR3 | CDR3 | FR4 | Frecuencia |
|---------|---------------------------------|---------------------|---------------------|------------|
| HVHP44 | RFTISRDNKNTLYIQMNSLRAEDTAVYYCAK | DEPRSVSGLRGV-VDS | WGRGTLVTVSS | 1 |
| HVHB82 | | GT | -----MEV ..K..T.... | 1 |
| HVHP421 | | .GKGS..YDH--P.Y | ..Q..... | 3 |
| HVHP419 |S.....G.....R | SWSG.SY.GD---L.. | ..Q..... | 1 |
| HVHP430 |V..... | VR E.Y.CSGTSCPGAF.I | ..Q..M.... | 2 |
| HVHP429 |N.....PD..... | GPINTGR-----YGD | ..Q..... | 24 |
| HVHM41 | | EGMVRGVSSAP--F.Y | ..Q..... | 1 |
| HVHM81 |G...L...R | QSITGPT.A----F.V | ..Q..M.... | 1 |
| HVHP428 |D..SIA.....M...R | RAKDGYNP---E.Y | ..Q..... | 52 |
| HVHP420 |D.....KT.....TT | .RDH.-----SG. | ..Q..... | 5 |
| HVHP414 |D.....KT.....TT | .QANA-----F.I | ..Q..M.... | 4 |
| HVHP423 | ..S.....L...R | EREGA.T-----RED | ..Q..... | 4 |
| HVHP44B | ..S.....L...R | EREGA.T-----RED | ..Q..... | 4 |
| HVHP413 |R | ESRVGGGA----F.I | ..Q..M.... | 3 |
| HVHP426 |V.....R | QSITGPT.A----F.I | ..Q..M.... | 8 |

Figura 2

Figura 3A

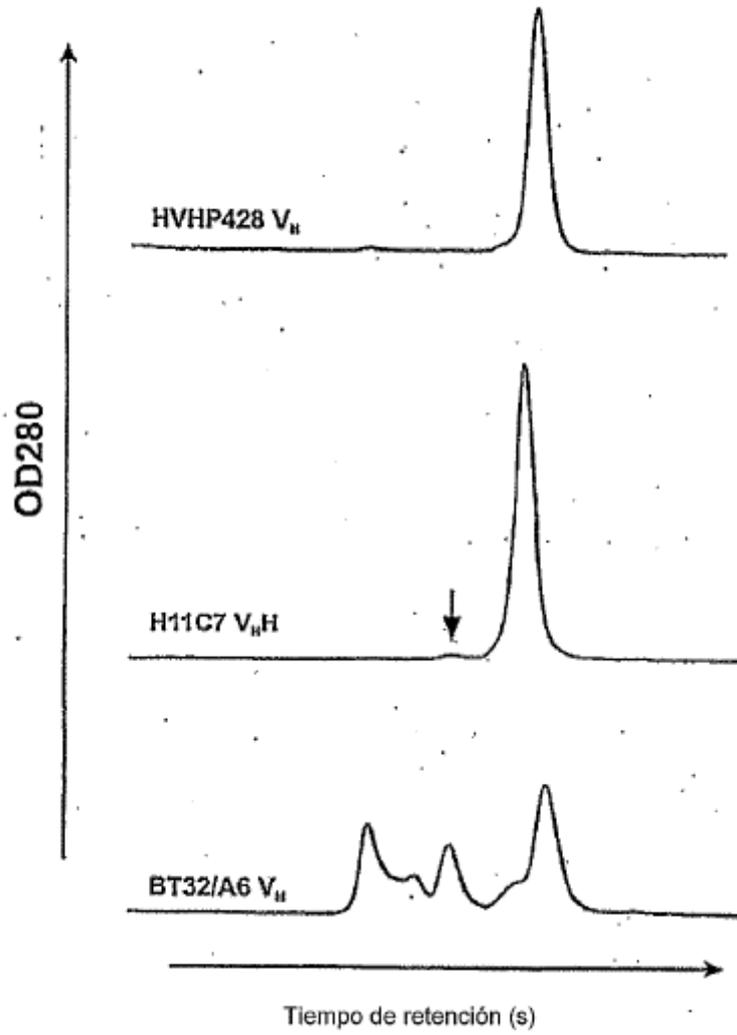


Figura 3B

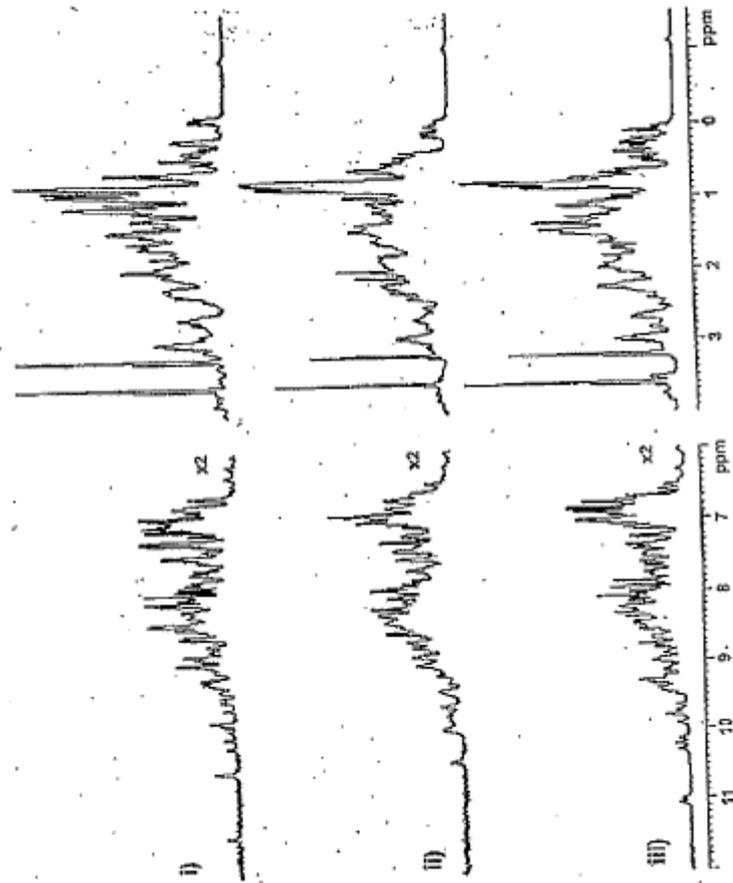


Figura 4A

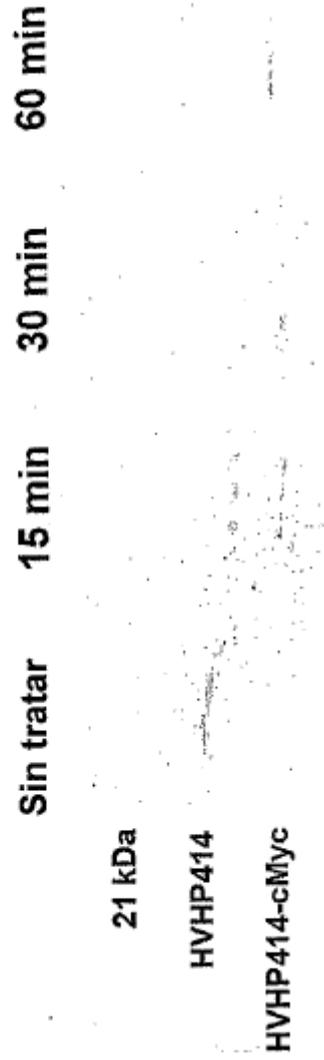


Figura 4B

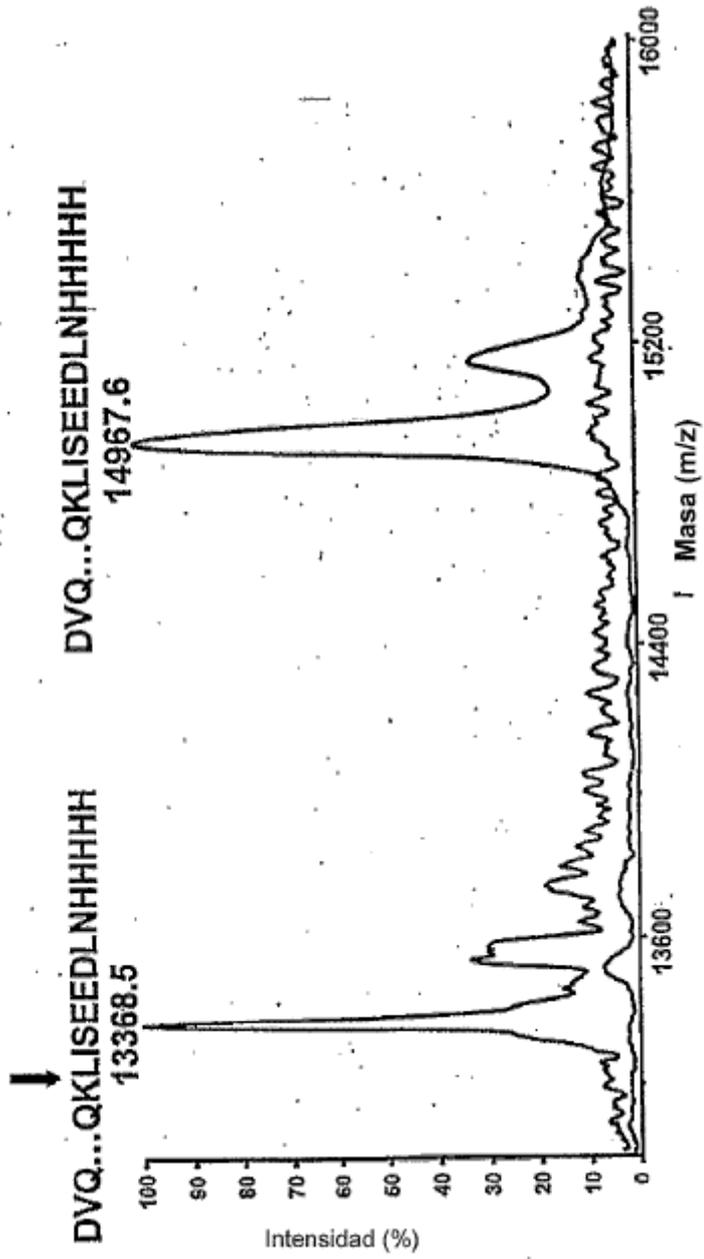


Figura 4C

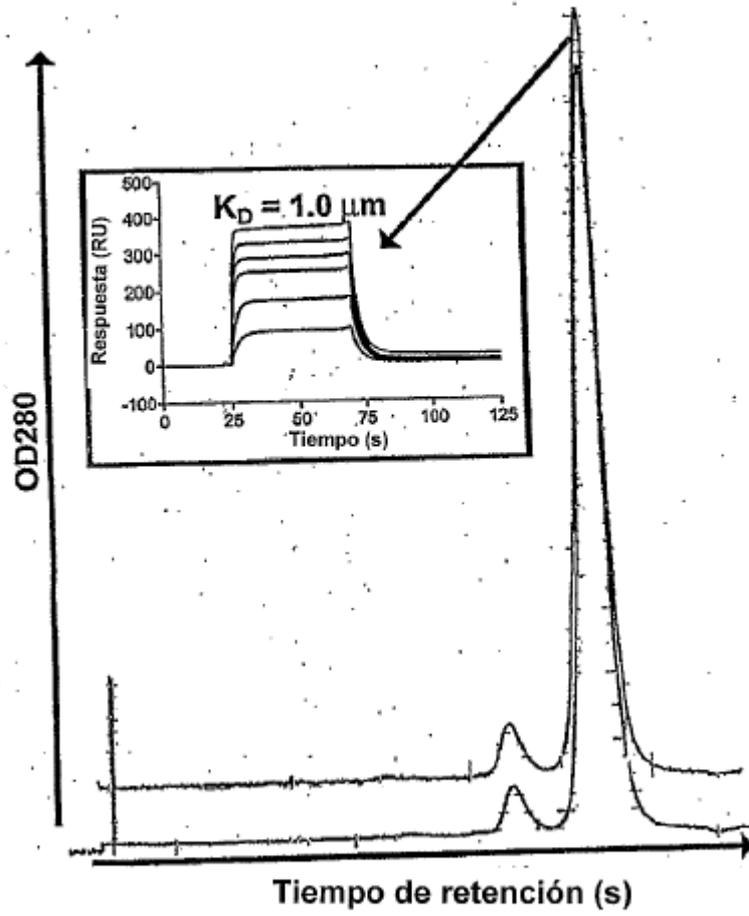
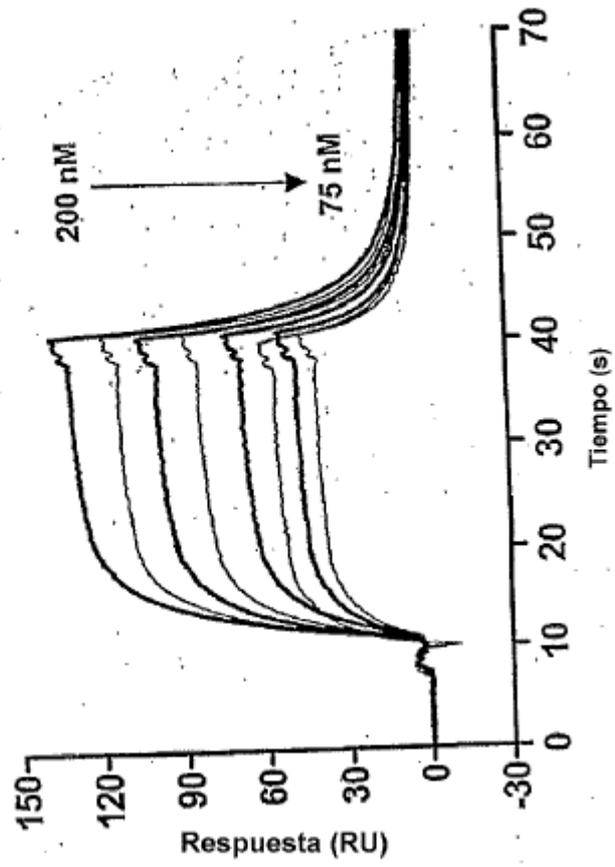


Figura 5



A-Subgrupo V_KIII

| | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 |
|---------------|--------------------------|---------------|-----------------|---------|---------------------------------|-------------|------------|
| | 10 | 30 | 40 | 60 | 70 | 90 | 100 |
| (i) L6 | EIVMTQSPATLSISPEGERATLSC | RASQSVSS--YLA | WFOOKPCQASRLLIY | EASNRAI | GIPARFSGSGSGTFTLTISKLEPEDFAYVCC | QQYGGSP--RT | FGQGTQVIVL |
| HVLP333(Jk1) | | | | | | | |
| HVLP356(Jk1) | | | | | | | |
| HVLP371(Jk1) | | | | | | | |
| HVLP381(Jk1) | | | | | | | |
| HVLP384(Jk1) | | | | | | | |
| HVLP3104(Jk1) | | | | | | | |
| HVLP3110(Jk1) | | | | | | | |
| HVLP356(Jk4) | | | | | | | |
| HVLP325(Jk4) | | | | | | | |
| HVLP349(Jk4) | | | | | | | |
| HVLP351(Jk4) | | | | | | | |
| HVLP388(Jk4) | | | | | | | |
| HVLP3100(Jk4) | | | | | | | |
| HVLP3108(Jk4) | | | | | | | |
| HVLP393(Jk2) | | | | | | | |
| (ii) AZ7 | | | | | | | |
| HVLP334(Jk1) | | | | | | | |
| HVLP336(Jk1) | | | | | | | |
| HVLP3106(Jk1) | | | | | | | |
| HVLP382(Jk1) | | | | | | | |
| (iii) L2 | | | | | | | |
| HVLP383(Jk2) | | | | | | | |
| HVLP3103(Jk2) | | | | | | | |
| HVLP323(Jk1) | | | | | | | |
| (iv) L16 | | | | | | | |
| HVLP364(Jk2) | | | | | | | |

Figura 6a

B. Subgrupo Vkl

(j) UZUTZ

HVLP328(Jk1) D.Q.L...SS..A.V.D.V.IT.I.T--..NK.PK.... A..SLES .V.S....R.....V.S.Q.....T.F. ..GYTT.---.
 HVLP324(Jk1) D.Q.....SS..A.V.D.V.IT.I.T--..NK.PK..F A..TLQS .V.S.....N.Q.....T.Y. ..SY.T.---. ..H.....
 HVLP397(Jk1)SS..A.V.D.V.IT.TI.---N .F.....K.PK.... A..SLQS .V.S.....S.Q.....T.Y. ..SYTT.---.EIK
 HVLP322(NF) D.Q.....SS..A.V.D.V.IP.I.---NK.PK.... A..SLQS .V.S.....S.Q.....T.Y. ..SY.T.---.P
 HVLP330(NF) D.Q.....PS..AFV.D.V.IT.E..GN--S.S ..L...KNP...VS GG.FLQS .VS.....A..L.....TG.RLD.S.T.Y. ..SDAV.---. ..H.....S..
 (ii) A30
 HVLP342(Jk1) D.Q.....SS..A.V.D.V.IT.DIRT--D.D .F..R..R.PHR... G..SLQG .V.S.....E.....G.Q.....T.Y. L.HHTY.---. ..L.....
 HVLP359(Jk1) D.Q.....SS..A.V.D.V.IT.DIRN--D.GM.PKR... G..RLQS .V.S.....E.....S.Q.....T.Y. ..SY.T.---.
 B.subgrupo VAI
 (j) TD
 HVLP389(JA3b) QS.V..P.S-V.AA..Q.V.I.. SG.SYNIGENSVSL..T.PK.... GNDK.PS ...D.....K...SA..G.TG.OTG.E.D.Y. GTWD.NIRASY ..G.....

Figura 6b

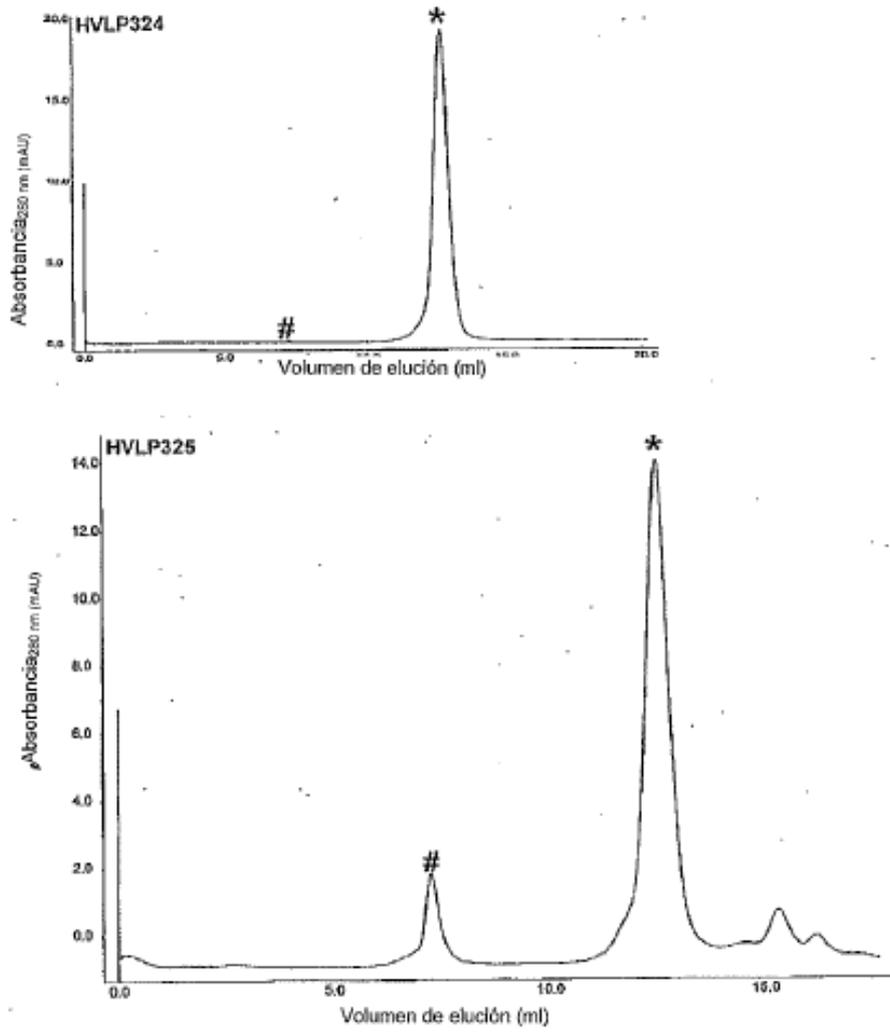


Figura 7A

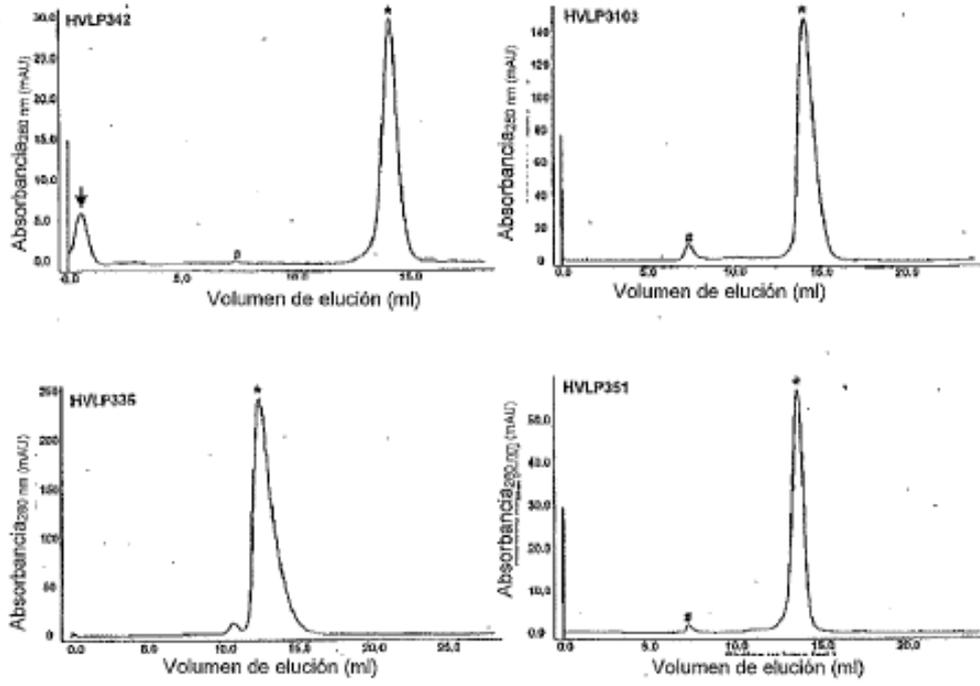


Figura 7B

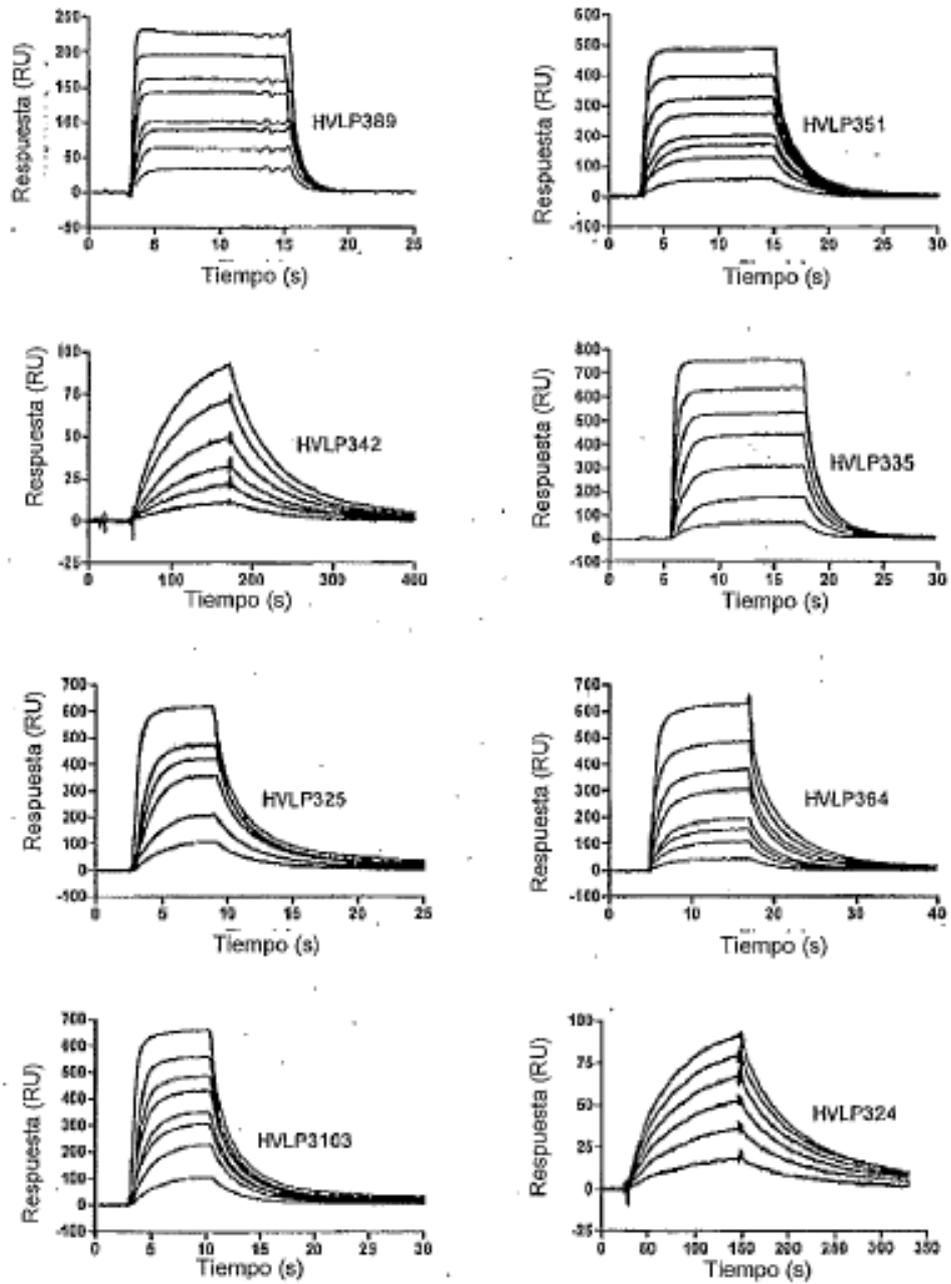
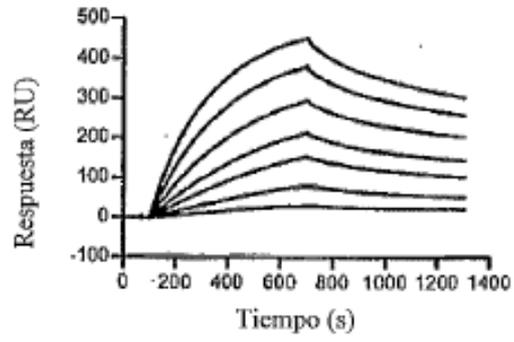


FIGURA 8

(A)



(B)

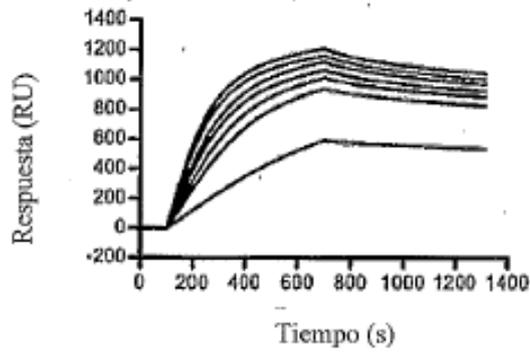


FIGURA 9

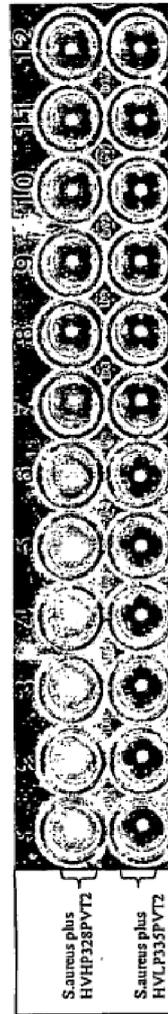


FIGURA 10